

Aus dem Lehrstuhl für Innere Medizin I
Prof. Dr. med. Martina Müller-Schilling



DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER
UNIVERSITÄT REGENSBURG

**Bedeutung von Proteasen, Siderophoren und Alpha-Hämolysin für
Infektionen mit *Staphylococcus aureus***

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Humanmedizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von

David Kenkel

2015

Abteilung für Infektiologie
Prof. Dr. med. Martina Müller-Schilling

DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER



**Bedeutung von Proteasen, Siderophoren und Alpha-Hämolysin für Infektionen mit
*Staphylococcus aureus***

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Humanmedizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von

David Kenkel

2015

Dekan:	Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. med. Bernd Salzberger
2. Berichterstatter:	PD Dr. Wulf Schneider
Tag der mündlichen Prüfung:	15.04.2016

Inhalt

Abbildungsverzeichnis	ii
Tabellenverzeichnis	ii
1 Einleitung	1
1.1 Forschungsstand	1
1.1.1 Siderophore	2
1.1.2 Proteasen	5
1.1.3 Hämolyse	13
1.2 Ziele der Arbeit	17
2 Methoden	18
2.1 Herkunft und Lagerung der Bakterien	18
2.2 Siderophore	19
2.2.1 Wachstumsbedingungen	19
2.2.2 Prinzip des Siderophore Assay	20
2.2.3 Herstellung der CAS assay solution	20
2.2.4 Messung der Bakterienkonzentration	21
2.2.5 Messung der Proteinkonzentration	21
2.3 Bestimmung proteolytische Aktivität	22
2.3.1 Proteasen (Assay)	23
2.3.2 Proteasen (Platten): Bestimmung der proteolytischen Aktivität auf Casein-Agar	25
2.4 Leukotoxine	27
2.5 Verwendete Software	28
3 Ergebnisse	29
3.1 Siderophore	31
3.2 Proteasen	36
3.3 Alpha-Hämolyse	38
4 Diskussion	40
5 Zusammenfassung	49
Danksagung	I
Referenzen:	II

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Synthese von Staphyloferrin A (8)	3
Abbildung 2 Synthese Staphyloferrin B (11)	4
Abbildung 3 Regulation von Aureolysin (25)	8
Abbildung 4 Struktur von Aureolysin (23)	10
Abbildung 5 Struktur von V8 (31)	12
Abbildung 6 Regulation SSP(V8) und Aureolysin (aur)(35)	13
Abbildung 7 Dreidimensionale Struktur des Monomers des Alpha-Hämolysins (39)	15
Abbildung 8 Dreidimensionale Darstellung des Alpha-Hämolysin-Heptamers (40)	15
Abbildung 10 Steuerung der Transkription von hla (49)	16
Abbildung 11 Caseinplatte zur Bestimmung der Proteasekonzentration	26
Abbildung 12 Hämolysenhöfe auf Kaninchenblutagarplatten	27
Abbildung 13 Siderophore Absorptionsdifferenz	34
Abbildung 14 Absorptionsdifferenz pro Proteinkonzentration	35
Abbildung 15 Siderophoreabsorptionsdifferenz/ log CFU	36
Abbildung 16 Fläche der Proteolysehöfe in mm ²	38
Abbildung 17 Boxplots: Fläche der Hämolysenhöfe in mm ²	39

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Überblick über die untersuchten Variablen und die Verteilung der Isolate	30
---	----

1 Einleitung

Staphylococcus aureus (*S. aureus*) ist einer der bedeutendsten Krankheitserreger in Deutschland, sowohl bei ambulant als auch nosokomial erworbenen Infektionen. Im Jahr 2006 schätzte das Robert Koch Institut die Zahl von nosokomialen Infektionen mit *S. aureus* auf 400.000 bis 600.000 Fälle, von denen etwa 10.000 bis 15.000 zum Tod führten. 14.000 dieser Staphylokokken waren Methicillin-resistente *Staphylococcus aureus* (MRSA) (1), die gegen die meisten Beta-Laktam Antibiotika resistent sind (2).

S. aureus verursacht eine Reihe unterschiedlicher Krankheitsbilder, unter anderem Furunkel, Karbunkel, Impetigo bullosa, postoperative Wundinfektionen, Abszesse, „Staphylococcal Scalded Skin Syndrome“, Endokarditis, Sepsis, Pneumonie und Osteomyelitis. Diese große Bandbreite an Krankheitsbildern wird unter anderem durch eine hohe Zahl von Virulenzfaktoren erreicht: Behinderung der Immunabwehr (z.B. Protein A, Koagulase, Leukozidine), Eindringen ins Gewebe (Proteasen, Staphylokinasen, Lipasen, Nukleasen), Bindung ans Endothel (Bindeproteine für Fibrinogen, Laminin, Kollagen, Fibronectin), sowie Toxine (Alpha-Toxin, Delta-Toxin, PSMs, Enterotoxine, Toxic Shock Syndrome Toxin (TSS), Exfoliatin A/B (SSSS)) (3).

1.1 Forschungsstand

Wie Zdzalik und Chan feststellen, ist das Verständnis für die genauen Abläufe der Pathogenese noch unzureichend (4, 5). Dieser Umstand macht Virulenzfaktoren zu einem bedeutenden Thema für die Wissenschaft. Schließlich könnte ein besseres Verständnis der Pathogenese langfristig gezieltere Therapieoptionen ermöglichen, indem beispielsweise entscheidende Virulenzfaktoren ausgeschaltet werden. Im Nachfolgenden werden die in dieser Arbeit untersuchten Virulenzfaktoren unter Berücksichtigung des derzeitigen Forschungsstandes genauer betrachtet.

1.1.1 Siderophore

Eisen ist ein essentielles Spurenelement und spielt eine entscheidende Rolle bei einer Vielzahl biochemischer Prozesse. Es ist unter anderem Cofaktor von Peroxidasen, Katalasen, Monooxygenasen, Dioxygenasen und der Xanthin-Oxidase (6). Eisen kommt in der Natur hauptsächlich in schwer löslichen Eisen-(III)-hydroxiden vor. Im menschlichen Geweben und Körperflüssigkeiten tritt gelöstes Eisen nur in sehr geringen Mengen auf. Zur Beschaffung von Eisen sondern viele Mikroorganismen Siderophore ab (7). Darunter sind besonders kleine Moleküle zu verstehen, die eine hohe Affinität zu Eisen-Ionen haben und von den Mikroorganismen wieder aufgenommen werden können. Von *S. aureus* sind bis heute vier Siderophore publiziert: Staphyloferrin A und B, über die relativ viel bekannt ist, und Staphylobactin und Aureochelin zu denen deutlich weniger Arbeiten publiziert wurden. Staphylobactin wurde von einer Forschungsgruppe um Dale et al erstbeschrieben. Sie konnten zeigen dass *sbnE* ein Schlüsselen zur Produktion von Staphylobactin ist, eine genaue Analyse der Struktur und der Funktion dieses Moleküls bis jetzt fehlt. Aureochelin wurde von einer Forschungsgruppe von Courcol entdeckt. Es handelt sich um ein Molekül mit einer Masse von 577 Da, zu dessen Struktur und Funktion bisher keine weiteren Arbeiten publiziert wurden. (8). Aufgrund der Bedeutung von Eisen für den Stoffwechsel von *S. aureus* sind Systeme zur Eisenakquisition redundant angelegt. Alternative Strategien um den Bedarf an Eisen zu decken sind die Aufnahme von Eisenhydroxamat-Komplexen (9) und die Aufnahme von Häm (10).

1.1.1.1 Staphyloferrin A

Staphyloferrin A ist ein hydrophiles anionisches Molekül, das Eisen-(III)-Komplexe bildet. Es wird ribosomenunabhängig über den „nonribosomal peptide synthetase independent pathway“ (NIS) synthetisiert. Zur Bildung von Staphyloferrin A werden die NIS-Synthetasen SfaD und SfaB benötigt. Diese bilden aus D-Ornithin und zwei Molekülen, unter Energieverbrauch, in zwei Schritten Zitronensäure. Abbildung 1 zeigt die Syntheseschritte der Synthese von Staphyloferrin A und seine Strukturformel (8).

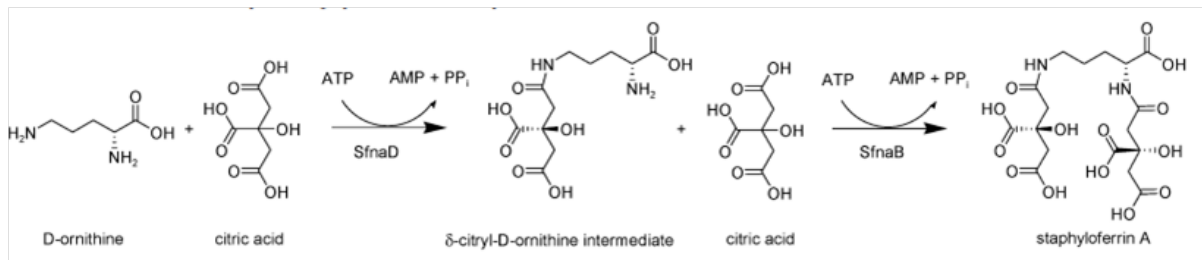


Abbildung 1 Synthese von Staphyloferrin A (8)

Für die Aufnahme von Staphyloferrin A in *S. aureus* werden die auf dem *htsABC*-Operon lokalisierten Proteine HtsA und HtsBC benötigt. Außerdem spielt die ATPase FhuC eine entscheidende Rolle. HtsA ist in der Zellmembran lokalisiert und weist eine positiv geladene Bindungsstelle für das anionische Substrat Staphyloferrin A auf (7). HtsABC gehört zur Familie der ABC-Transporter (ATP-Binding-Cassette), wobei FhuC die ATPase des Transporters ist. Niedrige Eisenspiegel haben einen positiven Einfluss auf die Expression der für die Synthese und den Import benötigten Proteine (7). Entscheidend für die Änderung der Proteinexpression unter Bedingungen des Eisenmangels ist Fur (ferric uptake regulator). Es bindet bei normwertigen Eisenkonzentrationen an die *fur* box und verhindert damit die Transkription der Gene. Wenn der Eisenlevel sinkt, löst sich die Bindung von Fur und die DNA wird der Transkription zugänglich (10).

1.1.1.2 Staphyloferrin B

Staphyloferrin B ist ein 448 Da großes Molekül. Die Biosynthese von Staphyloferrin B erfolgt, wie die von Staphyloferrin A, über den NIS-pathway. Die Enzyme für die Synthese von Staphyloferrin B sind auf dem *sbn*-Operon codiert. Hier werden die Proteine SbnABCDEFGHI codiert. In vitro konnte gezeigt werden, dass für die Bildung von Staphyloferrin B die NIS-Synthetasen SbnE, SbnC, SbnF und die ebenso wichtige Decarboxylase SbnH benötigt werden (11). Den Ablauf der Synthese und die Struktur von Staphyloferrin B veranschaulicht Abbildung 2.

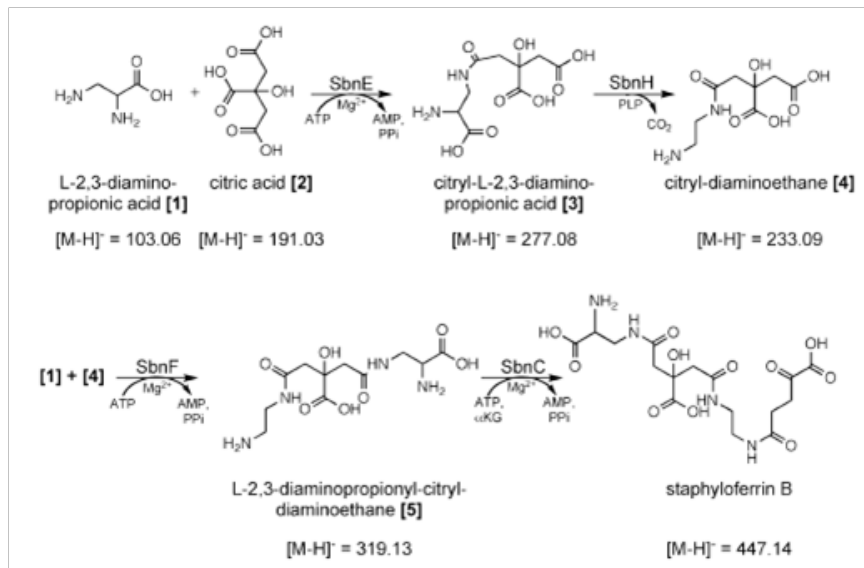


Abbildung 2 Synthese Staphyloferrin B (11)

Das Operon *sirABC* codiert für einen ABC-Transporter. Auch dieser Transporter benötigt für den aktiven Transport von Staphyloferrin B FhuC (ATPase). Die Expression dieses Exportsystems ist Fur und damit eisenabhängig (12).

Das Operon *sir* und das Operon *sbn* sind 230 Basenpaare voneinander entfernt. Auf diesem Zwischenstück befinden sich zwei *fur* Boxen, die für das Binden von Fur und damit für die Transkriptionskontrolle wichtig sind (12).

1.1.1.3 Sonstige Mechanismen der Eisenaufnahme

S. aureus nimmt neben den Siderophoren, die das Bakterium selbst produziert, auch unterschiedliche Siderophore auf, die von anderen Mikroorganismen synthetisiert werden. Diese werden Xenosiderophore genannt. Eine Gruppe von Xenosiderophoren sind Hydroxamat-Siderophore. Diese kann *S. aureus* aufnehmen, was unter anderem für Ferrichrom, Aerobactin und Desferrioxamin gilt. Für die Aufnahme werden die Genprodukte des *fhuCBG* Operons benötigt, *fhu* steht hier für ferric hydroxamate uptake. FhuB und FhuG sind lipophil und in der Zellmembran lokalisiert. FhuC ist die ATPase, die die Energie für den aktiven Transport bereitstellt. Sie ist im Zytosol lokalisiert und an FhuBG gebunden (13).

Außerdem spielen die in der Zellmembran verankerten Proteine FhuD1 und FhuD2 eine Rolle beim Transport der Hydroxamat-Siderophore. Sie werden wie die anderen Proteine negativ durch Eisen über Fur reguliert (14). Neben dem Mechanismus, Eisen über Siderophore zu akquirieren, steht *S. aureus* auch die Eisenaufnahme über Häm aus Hämoglobin zur Verfügung.

1.1.2 Proteasen

S. aureus produziert zehn wesentliche Exoproteasen. Dazu gehören eine Metalloprotease (Aureolysin), eine Serinprotease (SspA/ V8), zwei Cysteinproteasen (Staphopain A (ScpA) und Staphopain B (SspB)) und sechs serin-like Proteasen (15). Kolar et al. gehen davon aus, dass den Exoproteasen eine wichtige Bedeutung bei der Protektion von *S. aureus* vor dem Immunsystem des Wirts zukommt. Proteasen erhöhen die Wachstumsraten im Serum und im menschlichen Blut, insbesondere in der Anwesenheit antimikrobieller Peptide (AMP). Außerdem konnte von Kolar et al. gezeigt werden, dass extrazelluläre Proteasen *S. aureus* vor Phagozytose schützen.

Eine weitere Vermutung zur Rolle von Proteasen ist, dass sie zu einer Verminderung der Virulenz beitragen, indem sie Virulenzfaktoren von *S. aureus* zerstören, wie beispielsweise Alpha-Hämolysin. Dies könnte unter anderem bei der Kolonisation der Haut oder der Nasenschleimhaut mit *S. aureus* der Fall sein (16).

ScpA und SSpB sind für die Virulenz von *S. aureus* unterschiedlich wichtig. Kalinska et al. stellen die Bedeutung von Staphopain A als Virulenzfaktor in Frage. Sie konnten zeigen, dass ein Staphopain Knockout Mutant sich in seiner Virulenz nicht signifikant von einem Wildtyp-Stamm unterscheidet (17). Die Virulenz der Knockout-Stämme für Staphopain B im Maus-Modell war signifikant geringer als die der Wildtyp Stämme, was die Bedeutung von Staphopain B als Virulenzfaktor belegt (17). ScpA und SSpB spielen keine Rolle bei der Pathogenese bestimmter durch *S. aureus* induzierter Erkrankungen. So konnten

Genanalysen keinen Zusammenhang zwischen bestimmten Genen, die ScpA und SSpB codieren, und bestimmten Erkrankungen zeigen (4).

Erst im Jahr 2001 entdeckten Reed et al. sechs bis dato unbekannte **serin-like Proteasen**: SplA, SplB, SplC, SplD, SplE, und SplF (15). In der Stichprobe von Reed et al. wiesen 64% das *spl* Operon auf (15). Der Aufbau von SplA ist dem von Chymotrypsin ähnlich, dessen Struktur wiederum der einer Serinprotease der Familie S1 entspricht (18). SplA ist eine hoch selektive Protease, die ausschließlich Substrate spaltet, die Aminosäuren mit monozyklischen Resten enthalten. Damit ist vornehmlich Tyrosin und in geringerem Ausmaß Phenylalanin gemeint. Effizient spaltet SplA nur Proteine, die die Primärstruktur Trp/Tyr-Leu-Tyr-Thr/Ser aufweisen. Die Spaltungsgeschwindigkeit für Casein ist extrem langsam (18). In dieser Arbeit wird zur Untersuchung der proteolytischen Aktivität ein Assay auf Basis der Proteolyse von Casein durchgeführt. Der Beitrag von SplA zur proteolytischen Gesamtaktivität ist somit gering. SplB ist ebenfalls eine hochspezifische Protease. Sie spaltet effizient nur Proteine mit der Aminosäuresequenz Trp-Glu-Leu-Gln und selten Proteine, die um eine Aminosäure von dieser Sequenz abweichen. Elastin, Kollagen oder Albumin werden nicht von SplB gespalten, Beta-Casein hingegen schon (19). SplC ist eine Serinprotease, die in ihrem Aufbau V8 ähnelt. Sie besitzt, ähnlich wie V8, eine sehr begrenzte Substratspezifität. Diese lässt sich dadurch erklären, dass die katalytische Triade des aktiven Zentrums von SplC durch eine flexible Schleife blockiert wird. Aufgrund dieser begrenzten Substratspezifität ist es unwahrscheinlich, dass die Hauptfunktion in der Bereitstellung von Aminosäuren für das Wachstum liegt. Beta Casein wird von SplC nicht hydrolysiert (20). Es wäre möglich, dass SplC für die Entstehung der Sepsis relevant ist. Zwar konnte Zdzalik et al. keinen Zusammenhang zwischen der Prävalenz von Genen, die Proteasen codieren, und bestimmten Krankheitsmustern erkennen (4). Im Serum von Patienten, die an einer durch *S. aureus* verursachten Sepsis erkrankt sind, konnten hohe Konzentrationen an Antikörpern gegen SplC nachgewiesen werden (20). Es wäre also denkbar, dass SplC eine Bedeutung bei der Pathogenese der durch *S. aureus* induzierten Sepsis zukommt.

Park et al. konnten 2006 eine weitere Protease aus einem klinischen Isolat nachweisen, die 34-kDa große Serinprotease **Vspase**. Die Rolle und genaue Bedeutung dieser Protease ist bislang nicht hinreichend erforscht (21). Vspase spaltet Peptidbindungen, die C-terminal der zur spaltenden Bindung ein Glutamat tragen. Darüber hinaus benötigt Vspase zwei hydrophobe Aminosäuren N-terminal der zur spaltenden Verbindung. Proteolytisch aktiv ist das Enzym im pH-Bereich von 6,0 bis 8,5. Es hat eine optimale Aktivität bei 45°C. Die katalytische Triade wird von den Aminosäuren His119, Asp161 und Ser237 gebildet. Vspase spaltet Casein und außerdem BSA, Prothrombin, Plasminogen, Fibrinogen und γ -globulin (21).

V8 und **Aureolysin** tragen den Großteil zur proteolytischen Gesamtaktivität bei (22), sodass die Betrachtung dieser Proteasen für diese Arbeit am relevantesten ist. Deshalb geht der folgende Teil detailliert auf die V8-Protease (SspA) und Aureolysin (aur) ein.

1.1.2.1 Aureolysin

Aureolysin gehört zur Thermolysin-Familie der zink-abhängigen Metalloproteasen, besteht aus 301 Aminosäuren und hat eine Größe von 34kDa. Wie bei Thermolysin ist für die katalytische Aktivität die Anwesenheit von Zink und Kalzium essentiell. Abbildung 4 visualisiert die Struktur von Aureolysin (23).

Eine wichtige Aufgabe von Aureolysin ist die Initiation der proteolytischen Kaskade von *S. aureus*. Aureolysin aktiviert proSspA, das Zymogen von V8, die wiederum die Cystinprotease SspB aktiviert. Das Propeptid von Aureolysin wird autokatalytisch aktiviert durch ein Segment des Propeptids, das dem fungalysin-thermolysin-propeptide (FTP) entspricht, welches bei anderen Proteasen der Thermolysin-Familie gefunden wird (24). Auch in der Abwesenheit von Aureolysin können die Zymogene der Serinproteasen aktiviert werden. Dies erfolgt bei eingeschränkter Effizienz (16). Da V8 ebenso einen Großteil zur proteolytischen Gesamtaktivität beiträgt ist diese Eigenschaft von enormer Bedeutung.

Wie für die Siderophore gilt auch für die Proteasen, dass die Kenntnis über die Genregulation für die Einordnung der Ergebnisse von Bedeutung ist. Die Expression von Aureolysin wird durch *sarA*, *sarR*, *rot* und RNA III reguliert (Vgl. Abb.3). RNA III und *sarR* fungieren dabei als Aktivatoren der Expression. *SarR* beeinflusst die Transkription von Aureolysin direkt positiv und indirekt über die Suppression des Inhibitors *sarA*. RNA III hingegen beeinflusst die Transkription nur indirekt über eine Suppression des Inhibitors *rot*. *Rot* und *sarA* fungieren als Repressoren der Expression von Aureolysin (25). Es gibt außerdem noch weitere Faktoren, die sich auf die Expression von Aureolysin auswirken und im Schema von Oscarsson dargestellt sind (Vgl. Abb. 6).

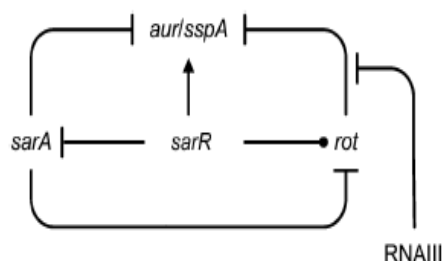


Abbildung 3 Regulation von Aureolysin (25)

“Relatively little is known about possible pathological functions of aureolysin.”, so Banbula et al. in der Zeitschrift "Structure" über die Relevanz von Aureolysin für Infekte mit S. aureus (23). Genanalysen zeigten keinen Zusammenhang zwischen dem Gen, das Aureolysin codiert, und bestimmten Erkrankungen (4). Dies lässt vermuten, dass Aureolysin keine bestimmte Infektion verursacht, gleichwohl dies auf Proteinebene noch nicht gezeigt wurde. Einige andere Publikationen lassen jedoch Vorteile hoher Konzentrationen von Aureolysin für bestimmte Erkrankungen vermuten (23) (26-30).

Es ist bekannt, dass Aureolysin das Biofilm-assoziierte Protein (Bap) spaltet (26). Dies erleichtert es Staphylokokken, sich aus dem Verbund des Biofilms zu lösen und invasiv zu werden. Da Aureolysin somit die Bindung an einen Fremdkörper im Rahmen eines Fremdkörperinfektes erschwert wäre es denkbar, dass die proteolytische Gesamtaktivität bei Fremdkörper assoziierten Infekten vermindert ist.

Einige der zur Thermolysin-Familie gehörenden Metalloproteasen können Matrixproteasen aktivieren und somit eine wichtige Rolle bei der Proteolyse und damit beim Eindringen in das Wirtsgewebe spielen (23). Diese Fähigkeit könnte einen Vorteil bei der Auslösung beispielsweise eines Abszesses oder bei der Entstehung von Wundinfekten darstellen.

Aureolysin bevorzugt Substrate mit hydrophoben P1'-Resten, also Substrate mit hydrophoben Aminosäuren c-terminal der zu hydrolysierenden Peptidbindung. Aureolysin hat einen Einfluss auf die Gerinnung: Aureolysin aktiviert die Fibrinolyse indem es Aktivatoren der Fibrinolyse aktiviert. So spaltet Aureolysin pro-UPA in seine aktive Form UPA (Urokinase Plasminogenaktivator) und inaktiviert Inhibitoren der Fibrinolyse. Beispielsweise inaktiviert Aureolysin Alpha-2-antiplasmin (α_2 -AP) und Plasminogen-Aktivator-Inhibitoren (PAI-1). Diese Eigenschaft von Aureolysin könnte eine besondere Bedeutung für Staphylokinase-defiziente Stämme haben, da diese Plasminogen nicht direkt durch die Staphylokinaseaktivität in Plasmin spalten können (27). Es wurden aber auch gerinnungsfördernde Eigenschaften von Aureolysin beschrieben. So soll Aureolysin Prothrombin aktivieren (28). Wenn die gerinnungshemmenden Effekte des Aureolysins überwiegen, könnte das ein Vorteil beim postoperativen Wundinfekt sein, da dadurch die Ausbildung eines Fibrinnetzes in der exsudativen Phase der Wundheilung behindert werden würde.

Aureolysin inaktiviert C3 und umgeht damit die komplementvermittelte Immunantwort, indem es C3 zwei Aminosäuren von der physiologischen Bindungsstelle entfernt spaltet, sodass dennoch funktionsfähiges C3a und C3b entsteht. Das C3b ist aufgrund der anderen Bindungsstelle zugänglich für eine wirtseigene Hydrolyse und damit für eine Inaktivierung (29). Eine weitere Eigenschaft von Aureolysin fördert das Umgehen der Immunantwort des Wirts. Es inhibiert die Aktivierung von Lymphozyten durch polyklonale AK, eine proteolytische Wirkung auf Serum Immunglobuline hat Aureolysin jedoch nicht (30). Dies könnte einen Vorteil bei der Infektion Immunsupprimierter darstellen oder beim postoperativen Infekt.

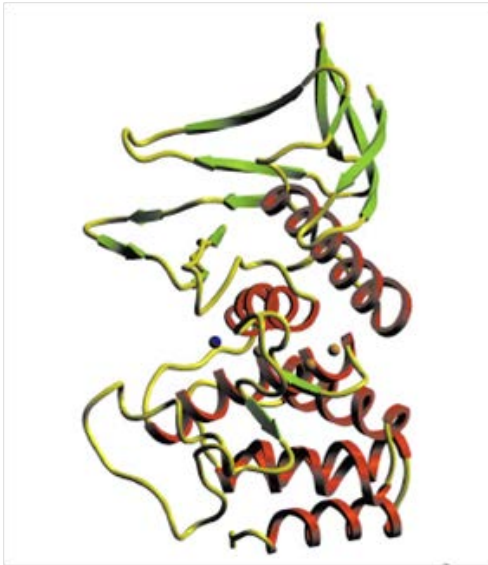


Abbildung 4 Struktur von Aureolysin (23)

1.1.2.2 *SspA/ V8*

V8 ist eine Serinprotease die in ihrer Struktur exfoliativ Toxin A (ETA) und exfoliativ Toxin B (ETB) ähnelt. Auch V8 trägt die Serinprotease typische katalytische Triade, die in diesem Fall aus den Aminosäuren His51, Asp93 und Ser169 besteht (31). Die Serinprotease hat ein Molekulargewicht von 12,000 Da und ist enzymatisch aktiv bei einem pH-Wert von 3,5 bis 9,5. Das pH-Optimum liegt bei 4 bis 7,8 (32). Bevorzugte Substrate von V8 sind negativ geladene Glutaminsäure sowie in einem geringeren Maße Asparaginsäure (33).

Die Serinprotease V8 spaltet einige Serumproteine beispielsweise fibronectin-binding Protein (34). Fibronectin-binding Protein ermöglicht es *S. aureus* an die Zellen des Wirtsorganismus zu binden. Die durch V8 induzierte Inhibition des fibronectin-binding Proteins könnte einen Nachteil bei der Invasion ins Wirtsgewebe beispielsweise bei Endokarditis darstellen, sodass sich eine verminderte Proteasekonzentration bei Patienten mit Endokarditis vermuten liesse.

Eine weitere Eigenschaft von V8 ist, dass es alle humanen Immunglobulinklassen an den schweren Ketten spalten und sie damit funktionsuntüchtig machen kann (15). Der menschliche Körper reagiert auf V8 mit der Produktion V8 spezifischen Antikörpern, welche

die Fähigkeit aufweisen, V8 zu inhibieren (34). Diese Eigenschaft könnte ein Vorteil bei der Infektion von Immunsupprimierten oder bei Wundinfekten sein. Insgesamt gilt die V8-Protease als Enzym mit einer zu engen Substratspezifität, als dass davon auszugehen wäre, die Hauptfunktion läge in der Beschaffung von Nährstoffen für das Wachstum (20).

V8 ist ein wichtiger Bestandteil der proteolytischen Kaskade von *S. aureus*. Aktiviert wird V8 aus proSspA, dem Zymogen von V8, durch Aureolysin. Die Serinprotease V8 wiederum aktiviert die Cystinprotease SspB (24). Oscarsson et al. konnten 2006 jedoch auch zeigen, dass die Aktivierung von V8 auch in der Abwesenheit von Aureolysin ablaufen kann, dann aber mit verminderter Effizienz (35).

Bap wird ebenfalls von V8 gespalten (26). Die Bildung eines Biofilms ist verbunden mit der Bildung von mit der Bakterienoberfläche assoziierter Proteine wie Biofilm associated Protein (Bap) und Fibronectin binding Protein (FnBP). Es ist davon auszugehen, dass *S. aureus* die Eigenschaft hat, sich aus dem Biofilm zu lösen und invasiv zu werden. Diese Eigenschaft wird durch Proteasen bedingt, die Membran-assoziierte Oberflächenproteine lösen können. Bap wird beispielsweise von Aureolysin und SspA gespalten (26). Es scheint jedoch kein kausaler Zusammenhang zwischen einzelnen Proteasen und dem Auftreten bestimmter Krankheiten zu existieren, zumindest wurde ein derartiger Zusammenhang bislang nicht nachgewiesen. Diese Arbeit betrachtet im Gegensatz dazu nun die proteolytische Gesamtaktivität und untersucht den Zusammenhang zwischen Proteasekonzentration und Krankheitsausprägung. Eine Genanalyse von Zdzalik et al. konnte keine Korrelation zwischen Protease-Genen und spezifischen Infektionen erbringen (4).



Abbildung 5 Struktur von V8 (31)

Das Gen *sspA*, das die V8-Protease codiert, befindet sich auf dem *sspABC*-Operon. Die anderen Genprodukte dieses Operons sind ebenfalls für die proteolytische Aktivität von *S. aureus* verantwortlich (Vgl. Staphopain B) (36). SspA wird als Präpropeptid synthetisiert und besteht aus 336 Aminosäuren (33). In einer Stichprobe von Zdzalik lag die Prävalenz für dieses Gen bei 100% aller untersuchten Staphylokokken (4). Die Expression von V8 wird analog zu der von Aureolysin reguliert. V8 wird durch *sarA*, *sarR*, *rot* und RNA III reguliert, wobei RNA III und *sarR* dabei als Aktivatoren der Expression fungieren. SarR beeinflusst die Transkription von V8 direkt positiv und indirekt über die Suppression des Inhibitors *sarA*. RNA III beeinflusst die Transkription von V8 hingegen nur indirekt über eine Suppression des Inhibitors *rot*. *Rot* und *sarA* fungieren als Repressoren der Expression von V8 (Vgl. Abb.3) (25). Es gibt jedoch noch weitere Faktoren, die sich auf die Expression von *sspA* auswirken. Diese sind im Schema von Oscarsson dargestellt (Vgl. Abb.6).

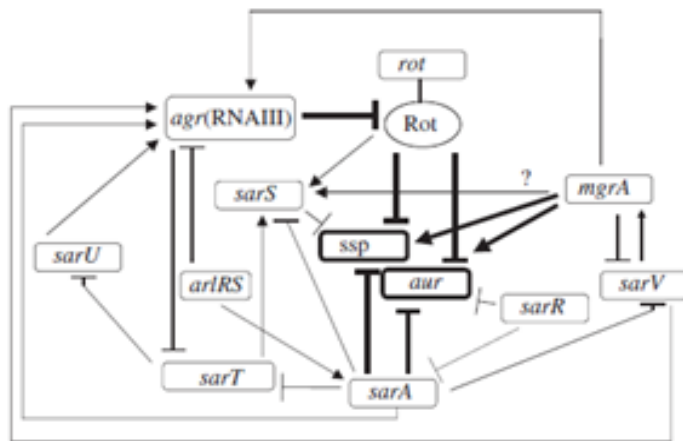


Abbildung 6 Regulation SSP(V8) und Aureolysin (aur)(35)

Genanalysen von Zdzalik et al. 2012 konnten keinen Zusammenhang zwischen bestimmten Genen, die V8 codieren, und bestimmten Erkrankungen zeigen (4). Dieses Erkenntnis wurde auch durch eine Untersuchung von Rice et al. 2001 belegt, bei der sich zeigte, dass V8 keine Rolle bei der Ausbildung von Abszessen spielt (36). Es handelte sich bei diesen Untersuchungen um Genanalysen, diese Arbeit ist die erste, die sich mit der Frage der Assoziation von Proteasen und bestimmten Krankheiten auf Proteinebene auseinandersetzt. Stämme, die *sar*- und *agr*-defizient waren, zeigten sich weniger virulent als der Wildtyp. Die *sar*- und *agr*-defizienten Stämme produzierten weniger Exoproteine wie beispielsweise V8 aber dafür deutlich mehr Oberflächenproteine (5). Dabei scheint der Mechanismus, der zur Virulenz beiträgt, unspezifisch zu sein.

1.1.3 Hämolyse

Im Folgenden werden der Aufbau und die pathogenen Eigenschaften des Alpha-Hämolyse beschrieben. Da durch das für diese Arbeit durchgeführte Assay hauptsächlich Alpha-Hämolyse erfasst wird, wird auf eine Darstellung der anderen Hämolyse verzichtet.

1.1.3.1 Alpha-Hämolyse

Alpha-Hämolyse ist ein aus 293 Aminosäuren bestehendes Protein (37) und wird als 33,2 kDa grosses (38) wasserlösliches Monomer von *S. aureus* sezerniert. Es wird auf dem *hla* Gen codiert. Abbildung 7 zeigt die dreidimensionale Struktur des Monomers des Alpha-

Hämolysins. Hierbei ist in hellgrün der Teil des Monomers dargestellt, welcher für die Bildung der Kanäle über nicht-kovalente Bindungen mit den anderen Monomeren verantwortlich ist. In dunkelgrün ist der transmembranöse Teil des Kanals dargestellt (39).

Diese Monomere bilden auf der Zellmembran Heptamere in Form von Kanälen. Diese messen 100 Å im Durchmesser und sind ebenso hoch. Ihr Molekulargewicht beträgt 232,4 kDa (40). Der Diameter der Pore des Kanals beträgt 1-2nm (38). Die Bildung dieser Kanäle erfolgt, indem *S. aureus* zuerst die wasserlöslichen Monomere sezerniert. Diese Monomere binden dann an die Zellmembran der Zielzelle und formen auf der Zielzelle nicht kovalent die Heptamere (37).

Neben dieser heptameren Form wurde von Furini 2008 im Biophysical Journal eine hexamere Form des Kanals postuliert, über deren Struktur jedoch bislang wenig bekannt ist (41). Eine dreidimensionale Darstellung des Alpha-Hämolysin-Heptamers bietet Abbildung 8. Diese Kanäle führen zur Lyse und damit zum Zelltod (39). Zielzellen für Alpha-Hämolysin sind beispielsweise Thrombozyten, Monozyten, Keratinozyten, Erythrozyten und Endothelzellen (40). Diese Zellen haben spezifische Bindungsstellen für Alpha-Hämolysin (38). Die Affinität für unterschiedliche Zielzellen ist dabei stark konzentrationsabhängig. So ist beispielsweise für die Lyse von humanen Erythrozyten eine Konzentration von 1 µM nötig, eine Lyse von Erythrozyten des Kaninchens erfolgt bereits bei einer Konzentration von 1 nM (40).



Abbildung 7 Dreidimensionale Struktur des Monomers des Alpha-Hämolysins (39)

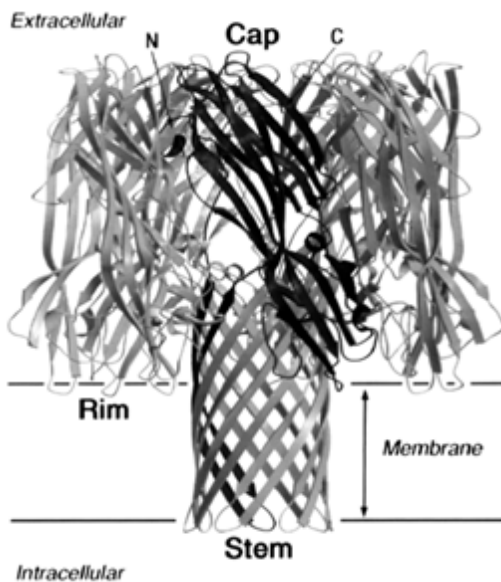


Abbildung 8 Dreidimensionale Darstellung des Alpha-Hämolysin-Heptamers (40)

Die Aktivität des Kanals ist von mehreren exogenen Faktoren beeinflussbar. So konnte gezeigt werden, dass hohe Ca^{2+} -Konzentrationen den Kanal reversibel schließen (38). Ebenso konnte von Sucharit et al 1991 nachgewiesen werden, dass Alpha-Hämolysin unter anderem durch Hydrokortison und Methylprednisolon inaktiviert wird (38). Ferner sind eine Reihe von alimentären Inhaltsstoffen Inhibitoren des Alpha-Hämolysins: Flavonoide (42), Allicin (43), Cyclodextrin-Cholesterol (44). Ebenso stört Simvastatin die Funktion des Alpha-Hämolysins (45). Es gibt allerdings auch Stoffe, die die Bildung der Kanäle beschleunigen

wie z.B. Desoxycholsäure (37). Bedeutsam für die Konzentration von Hämolytinen ist, dass die Expression von Hämolytinen stark vom Wachstumsmedium abhängig ist. Die Synthese von Alpha-Hämolytin wird beispielsweise im Vollblut deutlich stärker induziert als in TSB (46).

Durch die kleine Öffnung des Kanals können schnell monovalente Ionen strömen, ein schneller Einstrom des zweiwertigen Ca^{2+} ist jedoch nicht möglich. Dieser Ionenstrom verursacht die Lyse der Zelle. Es kann aber auch zur Apoptose kommen: So führt der Verlust an K^{+} Ionen in T-Lymphozyten zur Apoptose (37). Neben der durch Caspasen verursachten Apoptose kann Alpha-Hämolytin auch einen Caspase unabhängigen Nekrose ähnlichen Zelluntergang verursachen (47).

Die Hauptfunktion des Alpha-Hämolytins wird von Meesters et al. jedoch darin gesehen, aus dem Gewebe des Wirtes ein Nährmedium für das Bakterium zu machen (39). Schließlich stehen nach der Lyse von Zielzellen dem Bakterium eine Reihe vormals intrazellulärer Nährstoffe für das eigene Wachstum zu Verfügung.

Einen schematischen Überblick über die Steuerung der Transkription von *hla* bietet Abbildung 9. Hierbei fungiert *sarA* als Induktor der Alpha-Hämolytin-Produktion, indem es *sarT* supprimiert (48). Weitere Inhibitoren der Transkription von *hla* sind *sarS* und *rot*.

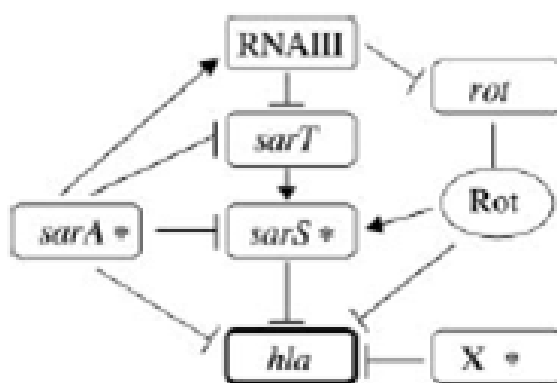


Abbildung 9 Steuerung der Transkription von *hla* (49)

Ebenso wird Alpha-Hämolysin von *agr* beeinflusst. Staphylokokken mit *agr*-Gen produzieren weniger Alpha-Hämolysin. In vivo hat *agr* jedoch keinen Einfluss auf die Synthese von Alpha-Hämolysin (50).

1.2 Ziele der Arbeit

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Rolle von drei Virulenzfaktoren für die Bedeutung der Pathogenese unterschiedlicher von *S. aureus* induzierter Infekte: Proteasen, Siderophore und Alpha-Hämolysin. Um die Bedeutung dieser drei Virulenzfaktoren für die Entstehung von Sepsis, Fremdkörperinfekten, TEP-Infektionen, Osteomyelitis, postoperative Wundinfektionen, Pneumonie, Endokarditis und Abszesse zu klären, wurden klinische *S. aureus* Isolate, die eine der genannten Erkrankungen verursachten, analysiert.

Insbesondere sollen folgende Fragen geklärt werden:

- 1) Unterscheiden sich *S. aureus* Isolate aus dem klinischen Alltag in der Produktion von Proteasen, Siderophoren oder Leukotoxinen?
- 2) Besteht eine Assoziation zwischen der Produktion der oben genannten Virulenzfaktoren und bestimmten Infektionserkrankungen?
- 3) Sind in dieser Arbeit gefundene Assoziationen zwischen Virulenzfaktoren und Krankheiten durch die Literatur erklärbar?

2 Methoden

Für die Beurteilung der Bedeutung von Siderophoren, Proteasen und Leukotoxinen für die Pathogenese von *S. aureus* wurden Patienten untersucht, die an unterschiedlichen durch *S. aureus* verursachten Infektionen erkrankt waren. Es wurde die Resistenzeigenschaften der Isolate (MRSA) und das Zielorgan der Infektion (primäre Invasivität, fremdkörperassoziierte Infektionen, TEP-Infektionen, Knocheninfektionen, Wundinfektionen, postoperative Wundinfektionen, Pneumonie, Endokarditis), sowie die Morphologie der Infektion (Abszess, ausgedehnter Weichteilinfekt) betrachtet.

Es wurden konsekutiv Isolate aus dem Zeitraum vom 06.09.2010 bis 12.05.2011 gesammelt. Es wurden 129 Isolate gesammelt und untersucht, von denen 95 in diese Studie eingeschlossen wurden. Ausgeschlossen wurden mehrfach vom gleichen Patienten isolierte Isolate und Isolate, die mit einem anderen Bakterium zusätzlich kontaminiert waren. Die Mehrzahl der Isolate stammt von Patienten der Universität Regensburg (Notaufnahme n= 12, Innere Medizin n=18, Gefäßchirurgie n=2, Augenheilkunde n=3, Chirurgie n=7, Herz-Thorax-Chirurgie n=11, HNO n=3, Neurochirurgie n=9, Unfallchirurgie n=5, Strahlentherapie n=1 und MKG n=1). Weitere Isolate stammen von umgebenden Krankenhäusern: Barmherzige Brüder Regensburg n=1, St. Josef Klinikum Regensburg n=1, Asklepios Klinik Burglengenfeld n=1 und Asklepios Klinik Bad Abbach n=11.

Die klinischen Informationen zur Eingruppierung der Patienten erfolgte auf der Grundlage von Patientenakten insbesondere der Arztbriefe.

2.1 Herkunft und Lagerung der Bakterien

Diese Isolate wurden freundlicherweise von dem Institut für Mikrobiologie und Hygiene der Universität Regensburg zur Verfügung gestellt und stammen von Patienten der oben genannten Krankenhäuser und Abteilungen.

Die langfristige Lagerung der Bakterien erfolgte in 10% Magermilchpulverlösung. Hierfür wurden 10g skim milk in 100 ml destilliertem Wasser gelöst und autoklaviert. Die Staphylokokken wurden in 0,5ml der Magermilchpulverlösung suspendiert und bei -80°C eingefroren.

Die kurzfristige Lagerung erfolgte auf Tryptic Soy Agar Platten (TSA). Hierfür wurden 7,5g Agar Agar und 15g TSB in 500 ml Wasser gelöst und bei 121°C für 15 min autoklaviert. Die bei -80 Grad eingefrorenen Staphylokokken wurden auf die Platten ausplattiert und bei 37°C für 12h inkubiert. Die Bakterien wurden im Kühlschrank für maximal 14 Tage bei 7°C gelagert.

2.2 Siderophore

2.2.1 Wachstumsbedingungen

Die Isolate wurden in mit 5ml Wachstumsmedium befüllte Reagenzgläser gegeben und für 24 Stunden bei 37 °C unter Rotation mit 220rpm inkubiert. Das Wachstumsmedium für die Isolate von *S. aureus* war modifiziertes RPMI 1640 von Sigma-Aldrich. Das modifizierte RPMI enthält kein Phenolrot, sodass eine Beeinträchtigung der Messung der Absorbanz im Bereich von 630nm vermieden werden kann. Außerdem ähnelt es in seiner Zusammensetzung dem von anderen Forschungsgruppen verwendeten Wachstumsmedium TMS (Tris-Minimum-Succinate) (12). RPMI enthält wie TMS essenzielle Nährstoffe und ebenso wie TMS enthält RPMI kein Eisen. Dies ist eine wesentliche Voraussetzung für die maximale Transkription der Siderophore, da niedrige Eisenspiegel einen positiven Einfluss auf die Expression der für die Synthese und den Import von Eisen benötigten Proteine haben (7).

Nach der Inkubation bei 37°C über 24h wurde je ein Milliliter in Eppendorftubes gefüllt und die Bakterien über 5 Minuten bei 10.000 rpm abzentrifugiert. Die Werte für die Siderophore

wurden sofort bestimmt, der Rest der Überstände wurde bei -20°C eingefroren zur späteren Bestimmung der Proteinkonzentration.

2.2.2 Prinzip des Siderophore Assay

Die Siderophore Aktivität wurde durch das von Schwyn und Neilands (51) beschriebene Assay bestimmt. Hierbei werden Überstände von Bakterienkulturen mit der Chromazurol S (CAS) assay solution 1:1 gemischt. Die CAS assay solution enthält den chrome azurol S/iron(III)/hexadecyltrimethylammonium bromide Komplex. Dieser Komplex hat seine maximale Extinktion bei 630nm. Der Farbstoff reagiert in Anwesenheit eines starken Chelator wie z.B. eines Siderophores unter Abgabe des Eisens mit einem Farbumschlag von Blau zu Orange (51). Es wurden je 100µl des Überstands und 100µl der CAS assay solution je well in eine 96-well Platte pipettiert. Die Absorbanz wurde bei 630nm mit einem ELISA reader in 96-well Platten bestimmt. Als Leerwert wurde die Absorbanz des Wachstumsmediums anstelle eines Bakterienüberstandes, welches wie die Bakterienkulturen bei 37°C für 24h inkubiert wurde, verwendet. Die Werte der Siderophore wurden in biologischen Triplikaten bestimmt, wobei je Triplikat die Absorbanz dreimal bestimmt wurde.

2.2.3 Herstellung der CAS assay solution

Vor jeder Messung wurde die Reaktionslösung frisch hergestellt, da temperaturunabhängig irreversible blaue Zusammenlagerungen beobachtet werden konnten. Zur Herstellung der CAS assay solution für eine 96-well Platte wie von Schwyn und Neilands beschrieben wurden 0,75ml einer 10mM HDTMA-Lösung, 0,188ml einer Eisen-(III)-Lösung, die aus 1mM FeCl₃ und 10mM HC bestand, 0,938 ml einer 2mM CAS-Lösung, 0,538g Piperazin, 0,78ml einer 12M Salzsäurelösung in ein Polyethylengefäß zusammengegeben und auf 12,5ml mit

destilliertem Wasser aufgefüllt. Anschließend wurde 1,25ml der CAS shuttle solution hinzugefügt, die aus einer 1%igen 5-Sulfosalicylsäure Dihydrat-Lösung besteht (51).

Das Hexadecyltrimethylamoniumbromid (HDTMA) stammt von Sigma chemical (Lot 73H0699), das Eisen-(III)-Chlorid stammt von Sigma-Aldrich (CAS No. 7705-08-0), das Piperazin stammt von Sigma-Aldrich (CAS No. 110-85-0), das Chromazurol S stammt von Aldrich chemistry (CAS No. 1667-99-8), die Salzsäure stammt von Merck (UN 1789) und das 5-Sulfosalicylsäure Dihydrat stammt von Sigma-Aldrich (CAS No.5965-83-3).

Für die Herstellung der 10mM HDTMA-Lösung wurden 0,364g in 100ml Wasser aufgelöst. Zur Herstellung der Eisen-(III)-Lösung wurden 990ml Wasser und 10ml einer 1M Salzsäurelösung zusammengegeben, sodass eine 10mM Salzsäurelösung entstand. In dieser wurden 0,162g Eisen-(III)-Chlorid aufgelöst, sodass dieses in einer Konzentration von 1mM vorlag. Zur Herstellung einer 2mM CAS Lösung wurden 1,21g Chromazurol S in 1000ml destilliertem Wasser gelöst. Für die CAS shuttle solution wurde 1g 5-Sulfosalicylsäure Dihydrat in 100ml gelöst, sodass 5-Sulfosalicylsäure-Dihydrat in einer 1%igen (w/v) Lösung vorliegt wie von Pernestig et al. beschrieben (52).

2.2.4 Messung der Bakterienkonzentration

Zur Messung der Bakterienkonzentration wurde die Bakterien-Suspension in RPMI 1640 auf 5×10^{-7} verdünnt. Von dieser verdünnten Nährlösung wurden 100µl auf TSA-Platten ausplattiert, 24h bei 37°C inkubiert und nach der Inkubation die Zahl der Kolonien gezählt (53). Die Messung der Bakterienkonzentration erfolgte in Duplikaten und die Angaben erfolgten in colony forming units pro Milliliter (CFU/ml).

2.2.5 Messung der Proteinkonzentration

Für die Messung der Proteinkonzentration in den Bakterienüberständen wurde die Konzentration mittels Bicinchoninsäure-Protein- Assay (BCA-Proteine-Assay) (Pierce

Biotechnology, Rockford, USA) bestimmt. Im ersten Teil der Reaktion reagiert in alkalischer Umgebung zweiwertiges Kupfer, in diesem Fall eine Kupfer-(II)-Sulfat-Lösung, mit Proteinen zu einwertigen Kupferionen. Im zweiten Reaktionsschritt reagiert die Bicinchoninsäure mit den einwertigen Kupferionen zu einem kräftigen violetten Komplex, wobei ein Kupferion mit zwei Molekülen Bicinchoninsäure reagiert.

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde ein Standard aus bovinem Serumalbumin (BSA) angefertigt. Hierzu wurde eine Stammlösung aus 2mg/ml hergestellt, indem 200mg BSA in 100ml destilliertem Wasser gelöst wurden. Diese Stammlösung wurde mit dem Wachstumsmedium RPMI-1640 Modified (R7509) auf folgende Konzentrationen verdünnt: 2000µg/ml (=100µl BSA Stammlösung), 1600µg/ml (=80µl BSA-Stammlösung+20µl RPMI), 1200µg/ml (=60µl BSA-Stammlösung+40µl RPMI), 1000µg/ml (=50µl BSA-Stammlösung+50µl RPMI), 800µg/ml (=40µl BSA-Stammlösung+60µl RPMI), 400µg/ml (=20µl BSA-Stammlösung+80µl RPMI), 200µg/ml (=10µl BSA-Stammlösung+90µl RPMI), 0µg/ml (=100µl RPMI).

Je Well wurden 10µl Standard bzw. 10µl der Bakterienüberstände in die Platten pipettiert, wobei Standard und Proben doppelt bestimmt wurden. Dazu wurden pro well 200µl Reaktionslösung hinzugegeben. Die Reaktionslösung besteht aus 20ml Bicinchoninic Acid solution und 0,4ml einer 4% (w/v) Kupfer-(II)-Sulfat-Lösung. Die 96-well Platte wurde für 30 Sekunden lang geschüttelt und für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde die Extinktion bei 540nm gemessen (54).

2.3 Bestimmung proteolytische Aktivität

Für die Bestimmung der proteolytischen Aktivität von *S. aureus* wurden zwei unterschiedliche Methoden verwendet. Zum einen wurde die proteolytische Aktivität durch mit Fluoreszenzfarbstoff markiertes Casein bestimmt und zum anderen durch die Größe der proteolytischen Höfe von *S. aureus*, die dieser auf Caseinagarplatten verursachte. Beide

Methoden zeigten sich in Bezug auf Ihre Genauigkeit und Reproduzierbarkeit als gleichwertig, sodass die Messung der proteolytischen Aktivität für alle Stämme von *S. aureus* mit der technisch aufwandsärmeren und kostengünstigeren Methode der Caseinplatten durchgeführt wurde.

2.3.1 Proteasen (Assay)

Zur Bestimmung der Proteasekonzentration wurde das Pierce Fluorescent Protease Assay Kit von Thermo Scientific benutzt (55). Das Kit basiert auf der von Twining entwickelten Methode, die Aktivität proteolytischer Enzyme durch Fluoreszenz-markiertes Casein nachzuweisen. Im Nachfolgenden werden kurz die Wachstumsbedingungen für die Bakterien beschrieben und darauf das Protease Assay detailliert beschrieben.

Für die Bestimmung der Proteasekonzentration wurden die bei -80°C eingefrorenen Bakterienisolate auf eine Casein-Agar Platte ausplattiert und für 24h bei 37°C inkubiert. Die Casein Agar Platten wurden freundlicherweise vom Institut für Mikrobiologie der Universität Regensburg zur Verfügung gestellt. Von diesen Platten wurde eine definierte Menge von Bakterien in 5ml Casein hydrolysat broth (CHB) gelöst und für 24h Stunden bei 37°C inkubiert, sodass sich diese in der stationären Phase und damit zum Zeitpunkt der maximalen Proteaseexpression befanden. Für die Herstellung des Wachstumsmediums CHB wurden 29,33g in 1000ml destilliertem Wasser gelöst und für 15 min bei 121°C und 1 bar Druck autoklaviert. Das CHB stammt von der Firma Fluka Analytical (C8845). Es konnte gezeigt werden, dass die proteolytische Aktivität vom Wachstumsmedium abhängig ist. So zeigten die Isolate bei Wachstum in Tryptic Soy broth (TSB) keine proteolytische Aktivität (Werte nicht gezeigt). Nach der Inkubation wurde ein ml der CHB/Bakterien-Lösung in eine Eppendorftube gefüllt und bei 4°C für 5min mit 10.000rpm zentrifugiert, sodass die Bakterien, welche sich als Bakterienpellet unten absetzten, von den Proteasen, welche im Überstand gelöst waren, getrennt wurden (22).

Für die Messung der Proteasekonzentration wurden in Triplikaten je well 100µl Trypsin Standard, 100µl Leerwert und 100µl der Bakterienüberstände pipettiert. Diese wurden mit 100µl Reaktionslösung versetzt und bei Raumtemperatur für 15min inkubiert. Anschließend erfolgte die Messung.

Für die Herstellung der Reaktionslösung wurde eine Fluorescein Isothiocyanat (FTC)-Casein Stammlösung 1:500 mit dem Tris Buffered Saline (TBS) Puffer verdünnt. Hierzu wurden 20µl der FTC-Casein Stammlösung und 9,98ml des TBS Puffer in ein Falcon Tube gegeben. Zur Herstellung des TBS Puffer enthielt das Kit bereits abgewogen Tris und NaCl, sodass diese nach Lösung in 500ml destilliertem Wasser in einer Konzentration von 25mM Tris und 150mM NaCl vorlagen. Der pH des Puffers liegt bei 7,2. Für die Herstellung der FTC Casein Stammlösung wurden 2,5mg FTC-Casein in 500µl destilliertem Wasser gelöst, sodass sich eine Stammlösung der Konzentration von 5mg/ml ergab. Diese Stammlösung wurde in Portionen von 25µl aufgeteilt und bei -80°C eingefroren und jeweils vor Herstellung einer FTC-Casein Reaktionslösung aufgetaut.

Zur Herstellung des Trypsin Standards wurde eine Stammlösung von Trypsin mit TBS in unterschiedliche Konzentrationen verdünnt. Zur Herstellung der Stammlösung wurden 50mg Trypsin in 1ml destilliertem Wasser gelöst, sodass diese in der Konzentration von 50mg/ml vorlag. Diese Stammlösung wurde in Portionen von 20µl in Eppendorftubes pipettiert und bei -80°C eingefroren. Zur Herstellung des Standards wurde eine erste Verdünnungslösung hergestellt, die aus 10µl Trypsinstammlösung und 9,99ml TBS. Diese erste Verdünnungslösung wurde abermals mit TBS verdünnt und bestand aus 200µl der ersten Verdünnungslösung und 9,8ml TBS. Aus dieser zweiten Verdünnungslösung wurde der Trypsin Standard hergestellt. Die Konzentrationen ergeben sich wie folgt: 1000µl zweite Verdünnungslösung (=1000ng/ml), 800µl zweite Verdünnungslösung + 200µl TBS (=800ng/ml), 600µl zweite Verdünnungslösung + 400µlTBS (=600ng/ml), 400µl zweite Verdünnungslösung + 600µl TBS (=400ng/ml), 200µl zweite Verdünnungslösung + 800µl

TBS (=200ng/ml), 50µl Stammlösung + 950µl TBS (=100ng/ml), 5µl Stammlösung + 995µl TBS (=50ng/ml).

Als Leerwert dienten 100µl CHB und 100µl Reaktionslösung. Nach einer Inkubationszeit von 15 min erfolgte die Messung mit Extinktions-/Emissionsfiltern von 485nm/538nm. Die Messung erfolgte auf der Basis der Fluoreszenz und des Förster-Resonanzenergietransfer. Bei der Fluoreszenz emittiert ein durch einen Quant angeregtes Molekül ein energieärmeres Photon. In diesem Fall wird das Fluorescein Isothiocyanat durch Licht der Wellenlänge von 485nm angeregt und emittiert Licht der Wellenlänge von 538nm. Beim Förster-Resonanzenergietransfer (FRET) handelt es sich um eine Form der Energieübertragung zwischen zwei Molekülen. Ein durch Licht, also in unserem Fall 485nm, angeregtes Donormolekül überträgt seine Energie auf ein Akzeptormolekül. Dies geschieht strahlungsfrei, also ohne energetische Verluste durch Emission oder Absorption von Photonen. Der Energietransfer ist dabei antiproportional zum Abstand der Donor und Akzeptormoleküle. In diesem Assay fungiert das Fluorescein Isothiocyanat sowohl als Akzeptor und als Donor. Diesen Effekt eines Homotransfers beschrieb Runnels 1995 (56). Lysieren die Proteasen nun das mit FTC markierte Casein so nimmt die Fluoreszenzlöschung (engl. Quenching) aufgrund des größeren Abstandes der FTC Moleküle zueinander ab, sodass die Fluoreszenz zunimmt. Das Fluorometer detektiert diese Emission von Quanten der Wellenlänge 538nm und gibt diese in relative fluorescence units (RFU) an.

2.3.2 Proteasen (Platten): Bestimmung der proteolytischen Aktivität auf Casein-Agar

Eine weitere und in ihrer Reliabilität gleichwertige Methode zur Detektion der proteolytischen Aktivität von *S. aureus* ist die Bestimmung der proteolytischen Aktivität auf Casein-Agar Platten. Hierzu wurden die Staphylokokken auf Casein-Agarplatten ausplattiert und für 24h bei 37°C inkubiert. Von diesen Bakterien wurde eine bestimmte Menge in mit 5ml Tryptic Soy Broth (TSB) befüllte Reagenzgläser gefüllt und für 24h bei 37°C inkubiert. Die

Reagenzgläser befanden sich dabei auf einem Schüttler und wurden mit 200rpm geschüttelt. Zur Herstellung des TSB wurden 15g in 500ml destilliertem Wasser gelöst und für 15min bei 121°C und 1bar Druck autoklaviert. Das TSB stammt von Fluka Analytical (T8907). Nach der Inkubation wurden die Caseinplatten mit den Bakterien beimpft, wobei die Beimpfung mit einer Pipettenspitze erfolgte. Zur Herstellung der Caseinplatten wurden 10g Casein sodium salt aus Kuhmilch und 7,5g Agar Agar in 500ml destilliertem Wasser gelöst, sodass Casein in einer Konzentration von 2% (w/v) vorlag. Bei dieser Konzentration war der beste Kontrast zwischen durch Proteolyse verursachten Höfen und dem nicht zersetzten Teil der Platte zu beobachten. Diese Lösung wurde für 15min bei 121°C und 1bar Druck autoklaviert und nach kurzem Abkühlen auf Petrischalen verteilt. Das Casein sodium salt stammt von Sigma Life Science (Cas No 9005-46-3) und das Agar Agar wurde freundlicherweise vom Institut für Mikrobiologie der Universität Regensburg bereitgestellt. Nach dem Beimpfen der Caseinplatten wurden diese für 48h bei 37°C inkubiert und nach der Inkubationszeit der Durchmesser der Proteolysehöfe ausgemessen. Diese Messung erfolgte in biologischen Quadruplikaten (57).

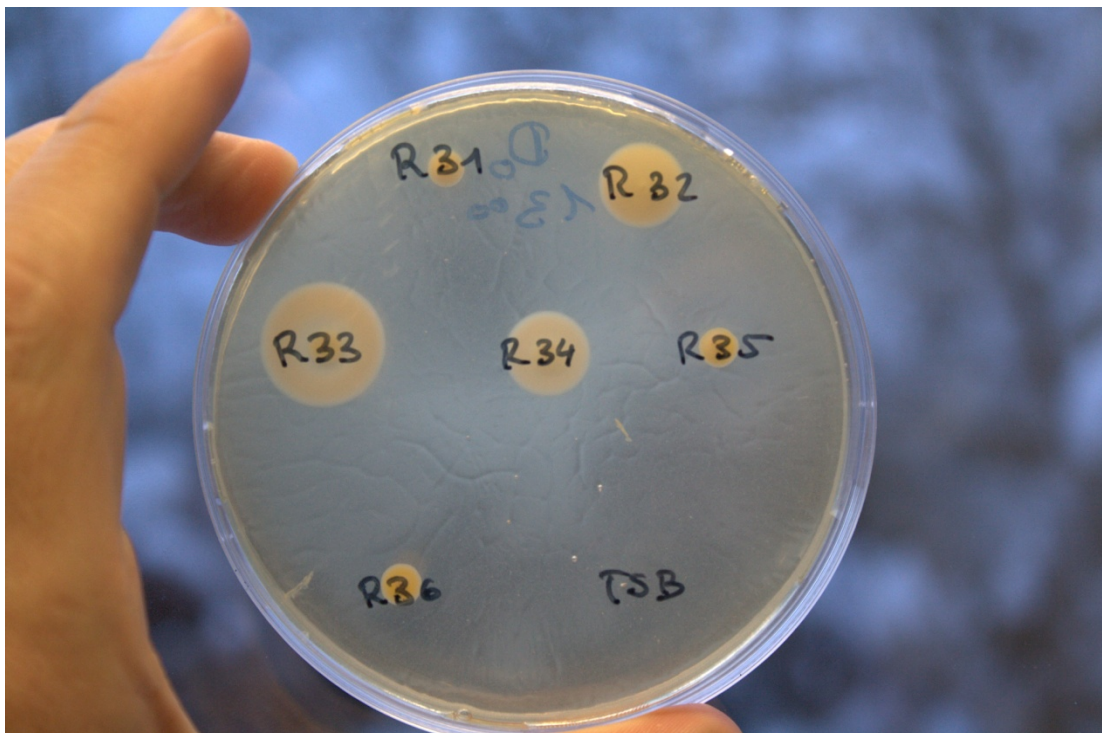


Abbildung 10 Caseinplatte zur Bestimmung der Proteasekonzentration

2.4 Leukotoxine

Die hämolytische Aktivität erfolgte nach dem Protokoll von Cooper et al. (58). Hierbei wurden 3%ige (vol/vol) Kaninchenblutagarplatten, die von der Mikrobiologie der Uniklinik Regensburg zur Verfügung gestellt wurden, verwendet. Blutagarplatten aus Kaninchenblut wurden deswegen verwendet, weil Alpha-Hämolysin spezifisch Kaninchenerythrozyten lysiert und dies auch schon bei niedrigen Konzentrationen macht ($< 50 \text{ nM}$) (37). Die Blutagarplatten wurden mit einer Pipettenspitze, die in mit TSB und Bakterien gefüllte Reagenzgläser getaucht, welche bereits 12h bei 37°C im Brutschrank inkubiert wurden, inokuliert. Diese Blutagarplatten wurden für 48h bei 37°C inkubiert und der Durchmesser der durch Hämolyse entstandenen Höfe gemessen (Siehe Abbildung 11).



Abbildung 11 Hämolysehöfe auf Kaninchenblutagarplatten

2.5 Verwendete Software

Die statistische Analyse erfolgte mit SPSS (IBM SPSS Statistics 19, Armonk, New York United States).

Insgesamt wurden 95 klinische Isolate von *S. aureus* untersucht. Von diesen 95 Stämmen waren 92,6% (n=88) *Methicillin-sensitive Staphylococcus aureus* (MSSA), 6,3% (n=6) waren MRSA und bei 1,1% (n=1) lag keine Information über diese Eigenschaft vor. Von den 95 Isolaten waren 40% (n=38) invasiv und 60% (n=57) nicht invasiv, wobei unter Invasivität Hinweise auf eine systemische Infektion verstanden wurden wie beispielsweise bei einer Endokarditis, einer Osteomyelitis, einer Sepsis, Urosepsis oder eines zentralen Katheterinfektes. Im Gegensatz dazu wurden lokale Infektionen wie postoperative Wundinfekte, Abszesse oder Follikulitiden als nicht invasiv eingeordnet. Als primäre Sepsis wurden 16,8% (n=16), nicht als primäre Sepsis wurden 82,1% (n=78) zugeordnet und 1,1% (n=1) konnten nicht zugeordnet werden. Unter primärer Sepsis wurde hierbei eine Sepsis verstanden, die nicht im Rahmen einer postoperativen Wundheilungsstörung oder eines anderen Infektfokus entstanden ist wie beispielsweise eine Pneumonie, Pankreatitis, Osteomyelitis oder Urosepsis. Eine Assoziation mit Fremdkörpern wiesen 20% (n=19) auf. Keine Assoziation zu Fremdkörpern hatten hingegen 80% (n=76). Zu den fremdkörperassoziierten Infekten zählen beispielsweise Infekte von Aortenstents, von ZVK, von Sternalcerclagen im Rahmen sternaler Wundheilungsstörungen und Protheseninfektionen. Einen TEP Infekt verursachten 2,1% (n=2) der Staphylokokken,. Ein weiteres Unterscheidungskriterium war das Vorliegen eines Knocheninfektes wozu Infekte des Sternums nach Sternotomie, chronische TEP Infektionen, Osteomyelitis und postoperative Knocheninfekte der Schädelkalotte gezählt wurden. Bei 8,4% (n=8) lag ein Knocheninfekt vor, bei 88,4% lag kein Knocheninfekt vor und bei 3,2% (n=3) ließ sich keine sichere Aussage diesbezüglich treffen. Ferner wurden die Isolate dahingehend unterschieden, ob Wundinfektionen (inklusive postoperativer Wundinfekte, traumatische Verletzungen und Ulzerationen) vorlagen. Einen Infekt im Rahmen eines Wundinfektes verursachten 50,5% (n=48), bei 48,4% lag kein Wundinfekt vor und bei 1,1% (n=1) ließ sich

keine eindeutige Zuordnung treffen. Bei 34,7% (n=33) handelte es sich um einen postoperativen Wundinfekt und bei 64,2% um keinen postoperativen Wundinfekt. Von den 95 Isolaten waren 5,3% (n=5) mit einer Pneumonie assoziiert, 94,7% (n=90) hingegen mit einem anderen Infekt. Eine Endokarditis verursachten 8,4% (n=8).

Ein weiteres Unterscheidungsmerkmal war der makroskopisch-anatomische Aspekt der Infektion: 18,9% (n=18) der Staphylokokken bildeten einen Abszess, 81,1% (n=77) bildeten hingegen keinen, waren also entweder systemische Infekte oder haben im Gewebe der Infizierten keinen Abszess gebildet. 51,6% (n=49) der Isolate verursachten einen ausgedehnten Weichteilinfekt. Hierzu zählten Wundinfekte, die keinen Abszess gebildet haben, aber auch Phlegmone, Bursitiden und infizierte Ekzeme. Nicht zu den ausgedehnten Weichteilinfekten zählten Abszesse, systemische Infektionen und Pneumonien. 48,4% verursachten keinen ausgedehnten Weichteilinfekt.

Ein weiteres Unterscheidungskriterium war, ob bei den infizierten Patienten eine Immunsuppression vorlag. Zu Patienten mit Immunsuppression wurden Patienten gezählt, die immunsuppressiv behandelt wurden u.a. mit Prednisolon, Dexamethason, Azathioprin, Methotrexat und Patienten mit immunsupprimierender Grunderkrankung wie HIV. Eine Immunsuppression wiesen 20% (n=19) der Patienten auf, nicht immunsupprimiert waren 50,5% (n=48) der Patienten und 29,5% (n=28) ließen sich nicht sicher zuordnen.

Einen Überblick über die untersuchten Variablen und die Verteilung der Isolate bietet Tab.1.

Tabelle 1: Überblick über die untersuchten Variablen und die Verteilung der Isolate

Variable	
MRSA	6,3% (n=6)
Invasivität	40% (n=38)
Primäre Sepsis	16,8% (n=16)
Fremdkörperassoziation	20% (n=19)

TEP-Infekt	2,1% (n=2)
Knocheninfekt	8,4% (n=8)
Wundinfekt	50,5% (n=48)
Wundinfekt postoperativ	34,7% (n=33)
Pneumonie	5,3% (n=5)
Endokarditis	8,4% (n=8)
Abszess	18,9% (n=18)
Ausgedehnter Weichteilinfekt	51,6% (n=49)
Patient immunsupprimiert	20% (n=19)
Wundinfekt postoperativ vs. kein Wundinfekt	29,5% (n=28)

3.1 Siderophore

In dieser Studie wurde die Konzentration von Siderophoren bestimmt. Es wurde überprüft, ob bestimmte Konzentrationen an Siderophoren mit einem bestimmten durch *S. aureus* induzierten Infekt assoziiert sind. Siderophore sind kleine Moleküle die eine hohe Affinität zu Eisen-Ionen haben. Diese Affinität der Siderophore ist höher als die des Eisen-Komplexes in der Reaktionslösung, sodass es zu einem Farbumschlag nach Zugabe der Siderophore in der Reaktionslösung kommt. Abbildung 12 zeigt die Absorptionsdifferenz zwischen dem Nullwert der Absorbanz ohne die Zugabe von Siderophoren und der Absorption der Reaktionslösung nach der Zugabe von Siderophoren. Hohe Werte entsprechen dabei einer hohen Konzentration an Siderophoren. Die untersuchten Gruppen unterscheiden sich nicht signifikant voneinander. Die zur Verwendung des T-Tests nötigen Voraussetzungen intervallskalierte Daten, normalverteilte Grundgesamtheiten und Varianzhomogenität der Stichproben, wurden geprüft: Zur Überprüfung der Normalverteilungsannahme wurde der Kolmogoroff-Smirnov- Anpassungs-Test verwendet. Zur Überprüfung der Varianzhomogenität wurde der Levene-Test verwendet. Der Levene-Test ergab für alle Variablen Varianzhomogenität.

Der Kolmogorov-Smirnov- Anpassungs-Test ergab mit einer Signifikanz von 0,732 bei der Siderophoreabsorptionsdifferenz eine Normalverteilung der Grundgesamtheit. Bei der Absorptionsänderung lag der Mittelwert bei 0,196 U das Minimum bei 0,022 U und das Maximum bei 0,31 U, die Absorptionsänderung/Proteinkonzentration reicht vom Minimum bei $2,66 \times 10^{-4} \frac{U}{ng/ml}$ bis zum Maximum von $2,36 \times 10^{-3} \frac{U}{ng/ml}$ und hatte einen Mittelwert von $7,6 \times 10^{-4} \frac{U}{ng/ml}$ und bei der Absorptionsänderung pro Bakterienkolonie lagen die Werte im Bereich von $7,72 \times 10^{-4} \frac{U}{CFU}$ bis $1,71 \times 10^{-2} \frac{U}{CFU}$ wobei der Mittelwert bei $2,58 \times 10^{-3} \frac{U}{CFU}$ lag. Die Größe der Proteolysehöfe war im Mittel $219 mm^2$ und reichte von $10 mm^2$ bis $363 mm^2$ und die Größe der Hämolysehöfe wies einen Mittelwert von $161 mm^2$ auf bei einem Minimum von $50 mm^2$ und einem Maximum von $452 mm^2$.

Abbildung 13 zeigt die Absorptionsdifferenz dividiert durch die Proteinkonzentration und Abbildung 14 die Absorptionsdifferenz dividiert durch den log der CFU. Für diese ergab sich keine Normalverteilung im Kolmogoroff-Smirnov- Anpassungs-Test. Bei einer Signifikanz von 0,008 der Aktivität der Siderophore gemessen in Absorptionsänderung/ Proteinkonzentration und einer Signifikanz der Aktivität der Siderophore pro Bakterienkolonie von 0,002 war die Nullhypothese die Aktivitäten seien normalverteilt zu verwerfen. Somit wurden die Mittelwerte der Aktivitäten nur durch den nicht parametrischen U-Test nach Mann-Whitney verglichen. Für die Absorptionsdifferenz konnte hingegen ebenso der T-Test verwendet werden.

Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede der Mittelwerte der Absorptionsdifferenz: MRSA (p=0,252), Invasivität (p=0,410), Primäre Sepsis (p=0,141), Fremdkörperassoziaton (p=0,570), TEP-Infekt (p=0,866), Knocheninfekt (p=0,185), Wundinfekt (p=0,115), Wundinfekt postoperativ (p=0,594), Pneumonie (p=0,766), Endokarditis (p=0,129), Abszess (p=0,791), Ausgedehnter Weichteilinfekt (p=0,227), Patient immunsupprimiert (p=0,107) und Wundinfekt postoperativ vs. kein Wundinfekt (p=0,583). Ferner ergab sich im U-Test nach Mann-Whitney auch kein signifikanter Unterschied für die Absorptionsdifferenz dividiert durch

die Proteinkonzentration (MRSA ($p=0,358$), Invasivität ($p=0,231$), Primäre Sepsis ($p=0,564$), Fremdkörperassoziation ($p=0,867$), TEP-Infekt ($p=0,193$), Knocheninfekt ($p=0,099$), Wundinfekt ($p=0,369$), Wundinfekt postoperativ ($p=0,527$), Pneumonie ($p=0,172$), Endokarditis ($p=0,199$), Abszess ($p=0,425$), Ausgedehnter Weichteilinfekt ($p=0,111$), Patient immunsupprimiert ($p=0,137$) und Wundinfekt postoperativ vs. kein Wundinfekt ($p=0,520$)) und die Absorptionsdifferenz dividiert durch den log der CFU (MRSA ($p=0,606$), Invasivität ($p=0,975$), Primäre Sepsis ($p=0,099$), Fremdkörperassoziation ($p=0,840$), TEP-Infekt ($p=0,359$), Knocheninfekt ($p=0,575$), Wundinfekt ($p=0,860$), Wundinfekt postoperativ ($p=0,872$), Pneumonie ($p=0,692$), Endokarditis ($p=0,080$), Abszess ($p=0,708$), Ausgedehnter Weichteilinfekt ($p=0,734$), Patient immunsupprimiert ($p=0,230$) und Wundinfekt postoperativ vs. kein Wundinfekt ($p=0,970$)).

Diese Ergebnisse zeigen für keine der untersuchten Variablen einen signifikanten Unterschied der Mittelwerte. Es lässt sich also festhalten, dass weder bei Infektionen mit MRSA, invasiven Infektionen, primärer Sepsis, fremdkörperassoziierten Infekten, TEP-Infektionen, Knocheninfekten, Wundinfekten, postoperativen Wundinfekten, Pneumonien, Endokarditiden, Abszessen, ausgedehnten Weichteilinfekten und bei Infektionen von immunsupprimierten Patienten ein signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe in Bezug auf die Siderophoreaktivität besteht.

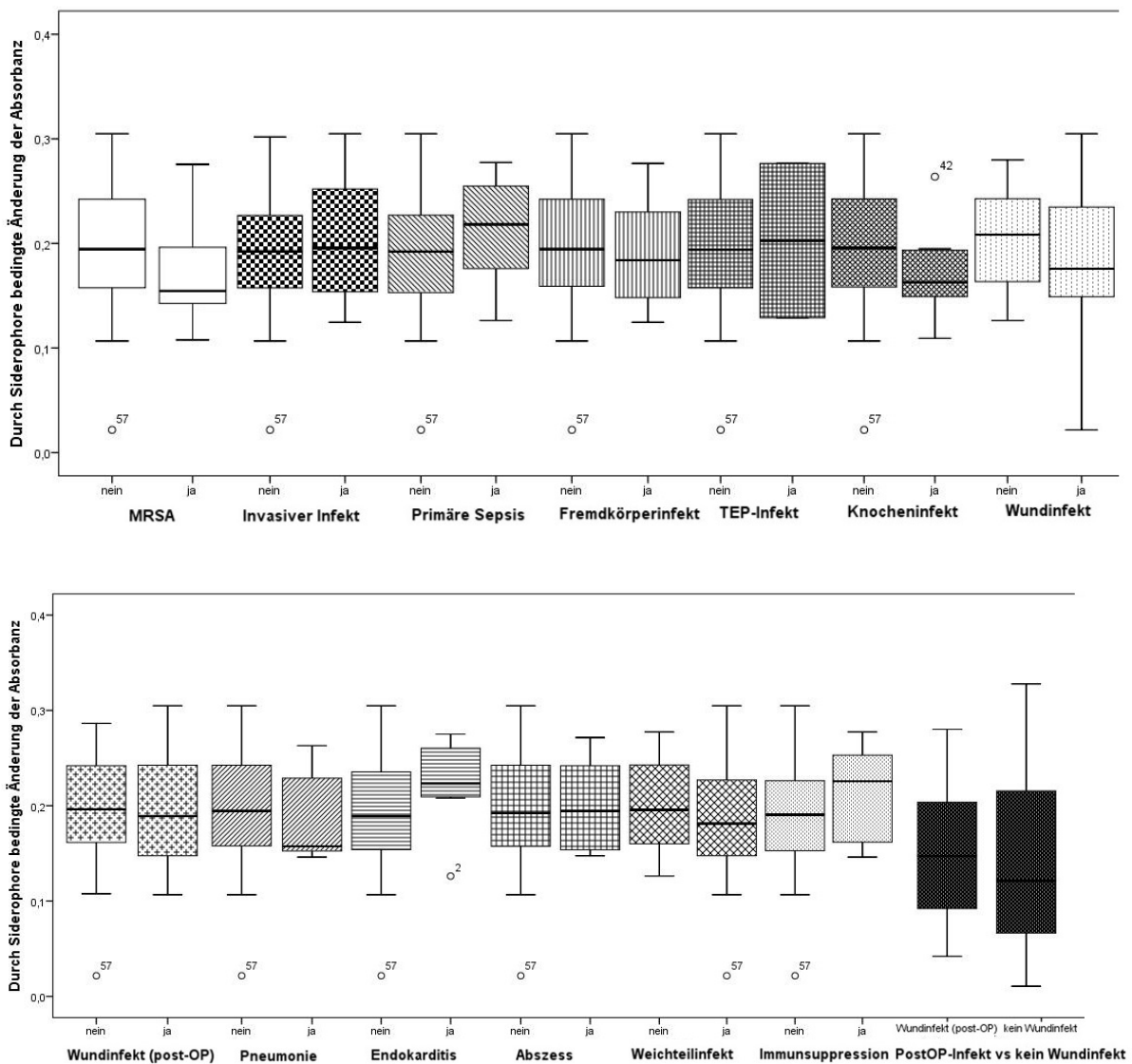


Abbildung 12 Siderophore Absorptionsdifferenz (U): Dargestellt sind alle Isolate: Infektionen mit MRSA, invasive Infektionen, primäre Sepsis, fremdkörperassoziierte Infekte, TEP-Infektionen, Knocheninfekte, Wundinfekte, Pneumonien, Endokarditiden, Abszesse, ausgedehnte Weichteilinfekte und bei Infektionen von immunsupprimierten. Zusätzlich wurde die Gruppe der postoperativen Wundinfekte mit allen Isolaten verglichen, die keinen Wundinfekt verursacht haben exklusive der Gruppe Wundinfekte (nicht postoperativ). Bei der Variablen „Wundinfekt (post-OP)“ wurden alle postoperativen Wundinfekte mit den allen anderen Isolaten verglichen inklusive der der Gruppe Wundinfekte.

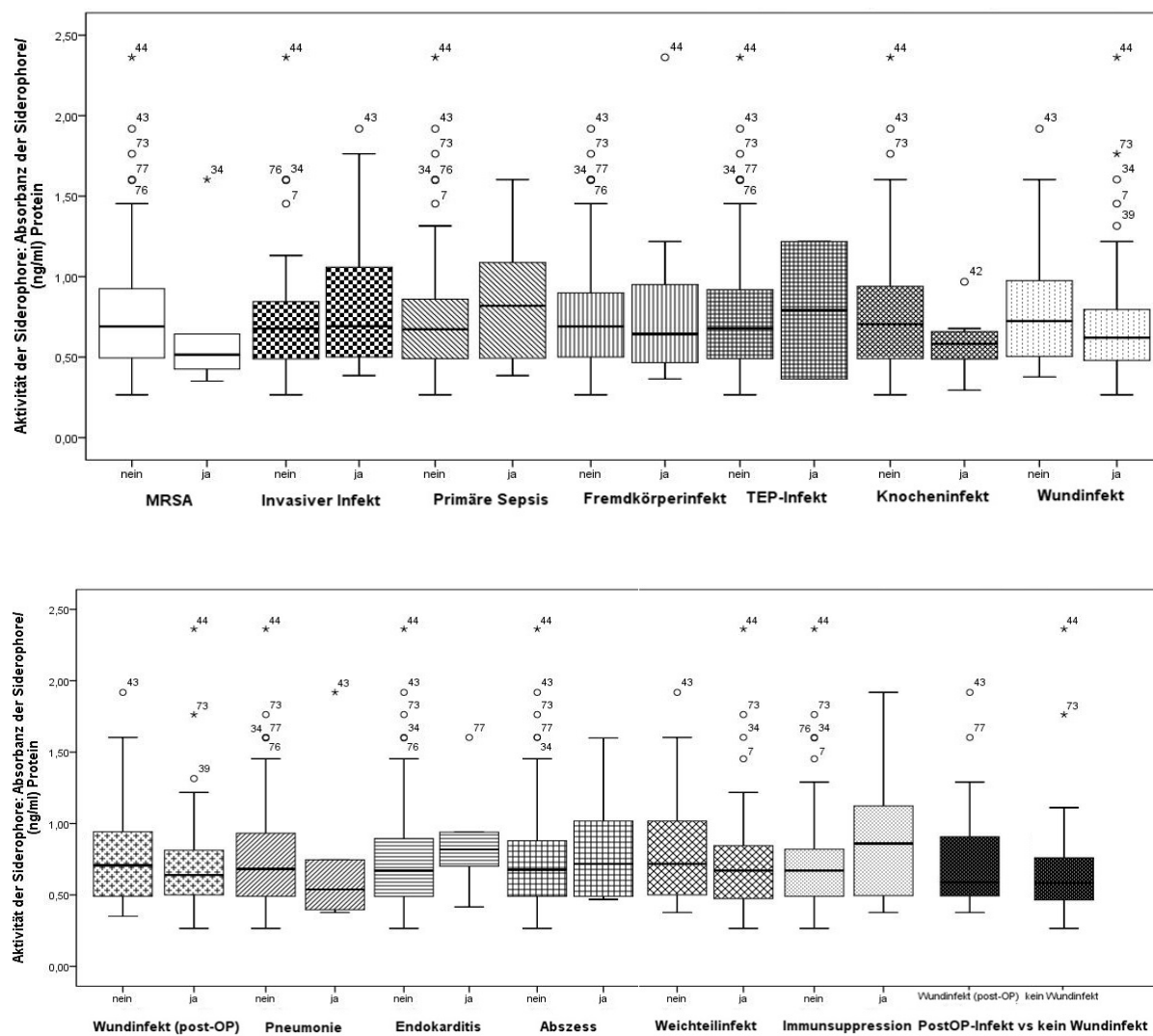


Abbildung 13 Absorptionsdifferenz pro Proteinkonzentration

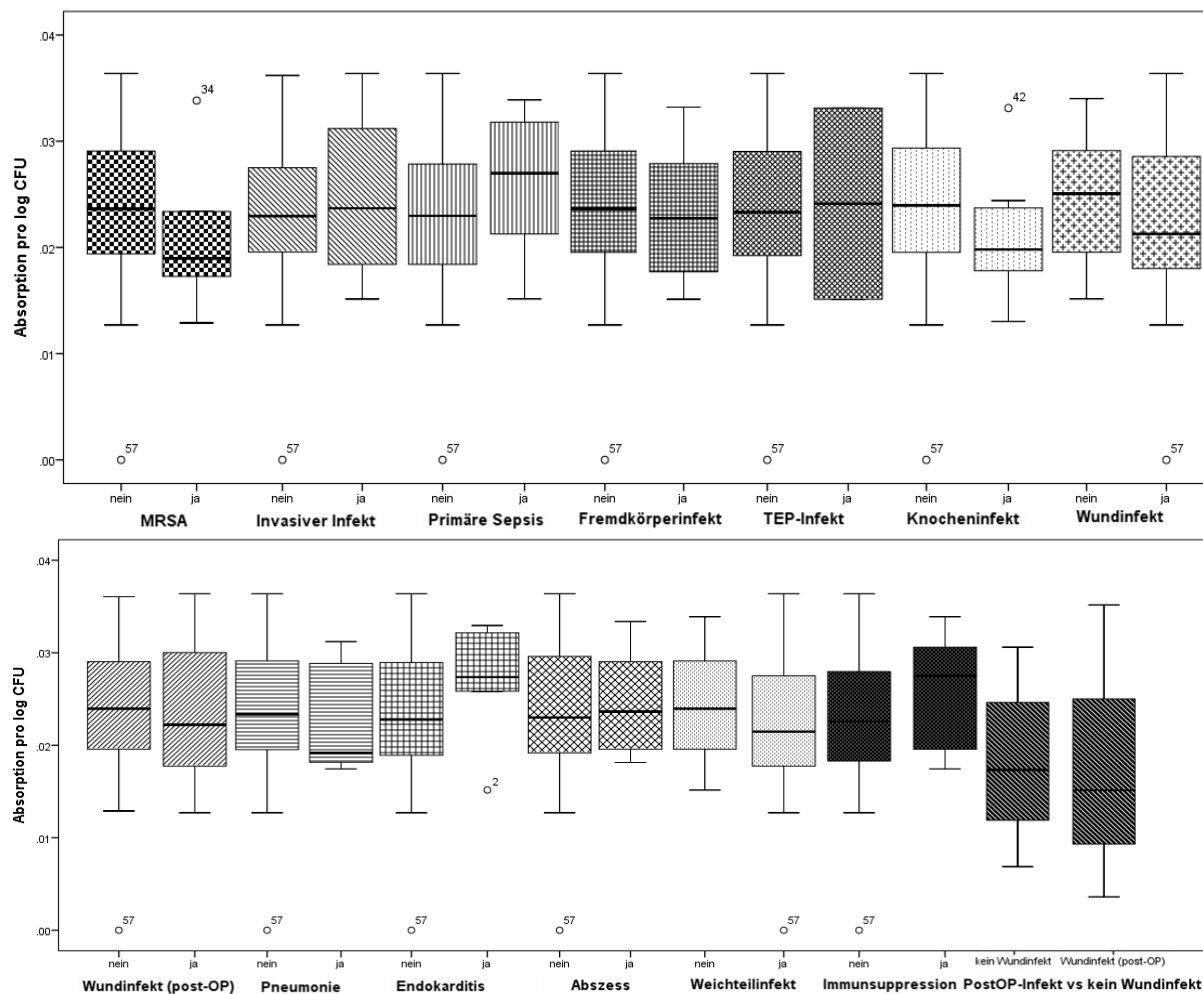


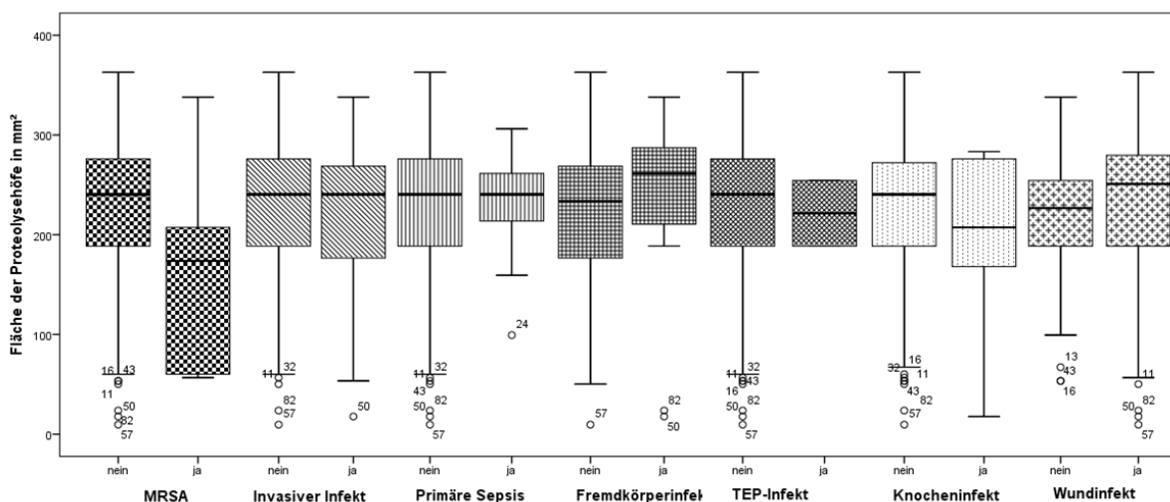
Abbildung 14 Siderophoreabsorptionsdifferenz (U) log CFU

3.2 Proteasen

Eine graphische Zusammenfassung der Ergebnisse der Bestimmung der proteolytischen Aktivität liefert Abbildung 15. Der Kolmogorov-Smirnov- Anpassungs-Test ergab mit einer Signifikanz von 0,107 bei der Proteasebestimmung eine Normalverteilung der Grundgesamtheit, sodass die Mittelwerte der Proteasebestimmung durch den T-Test und durch den nicht parametrischen U-Test nach Mann-Whitney verglichen werden konnte. Es zeigten sich für folgende untersuchte Variablen keinen signifikanten Unterschied der Mittelwerte: Infektionen mit MRSA, invasive Infektionen, primäre Sepsis, fremdkörperassoziierte Infekte, TEP-Infektionen, Knocheninfekte, Wundinfekte, Pneumonien,

Endokarditiden, Abszesse, ausgedehnte Weichteilinfekte und bei Infektionen von immunsupprimierten.

Die Proteasen von *S. aureus* sind hingegen signifikant mit postoperativen Wundinfekten assoziiert. Hier lag der p-Wert beim Mann-Whitney-U-Test bei 0,012 und damit deutlich unter dem Signifikanzniveau von 0,05. Noch deutlicher wird die Bedeutung der Proteasen bei postoperativen Wundinfekten wenn man die Gruppe der postoperativen Wundinfekte mit der Gruppe an Staphylokokken vergleicht, die keine Wundinfekte verursachten (z.B. Pneumonien, Sepsis, Endokarditis). Hier lag die Signifikanz bei $p=0,006$.



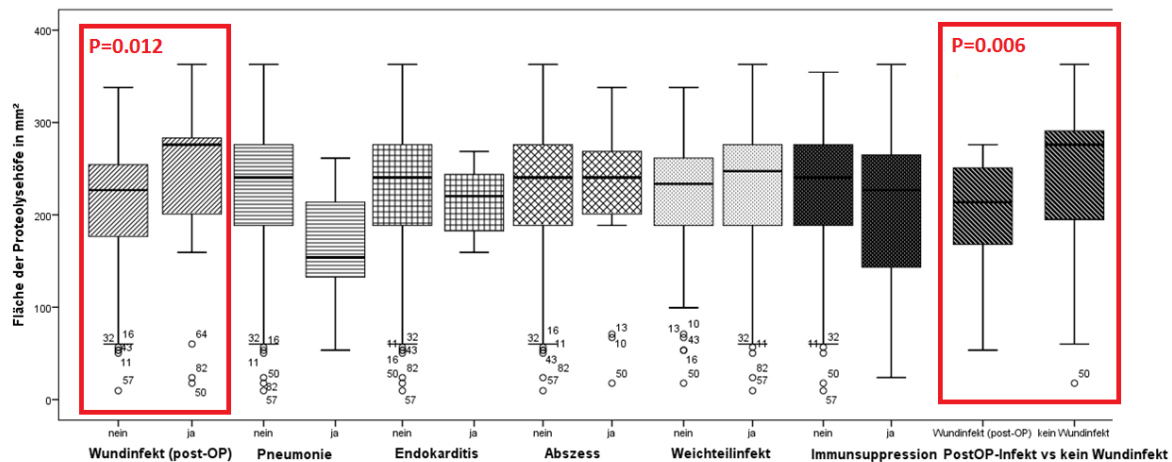


Abbildung 15 Fläche der Proteolysehöfe in mm²

3.3 Alpha-Hämolyisin

Abbildung 16 bietet einen Überblick über die Mittelwerte der Messung von Alpha-Hämolyisin. Der Kolmogorov-Smirnov- Anpassungs-Test ergab mit einer Signifikanz von 0,084 bei der Leukotoxinbestimmung eine Normalverteilung der Grundgesamtheit. Es konnten somit die Mittelwerte der Leukotoxinbestimmung durch den T-Test verglichen werden. Es gaben sich keine signifikanten Unterschiede der unterschiedlichen Gruppen: MRSA ($p=0,144$), Invasivität ($p=0,542$), primäre Sepsis ($p=0,750$), Fremdkörperassoziation ($p=0,311$), TEP-Infekt ($p=0,313$), Knocheninfekt ($p=0,958$), Wundinfekt ($p=0,651$), Wundinfekt postoperativ ($p=0,144$), Pneumonie ($p=0,427$), Endokarditis ($p=0,698$), Abszess ($p=0,450$), ausgedehnter Weichteilinfekt ($p=0,678$), Patient immunsupprimiert ($p=0,811$) und Wundinfekt postoperativ vs. kein Wundinfekt ($p=0,202$).

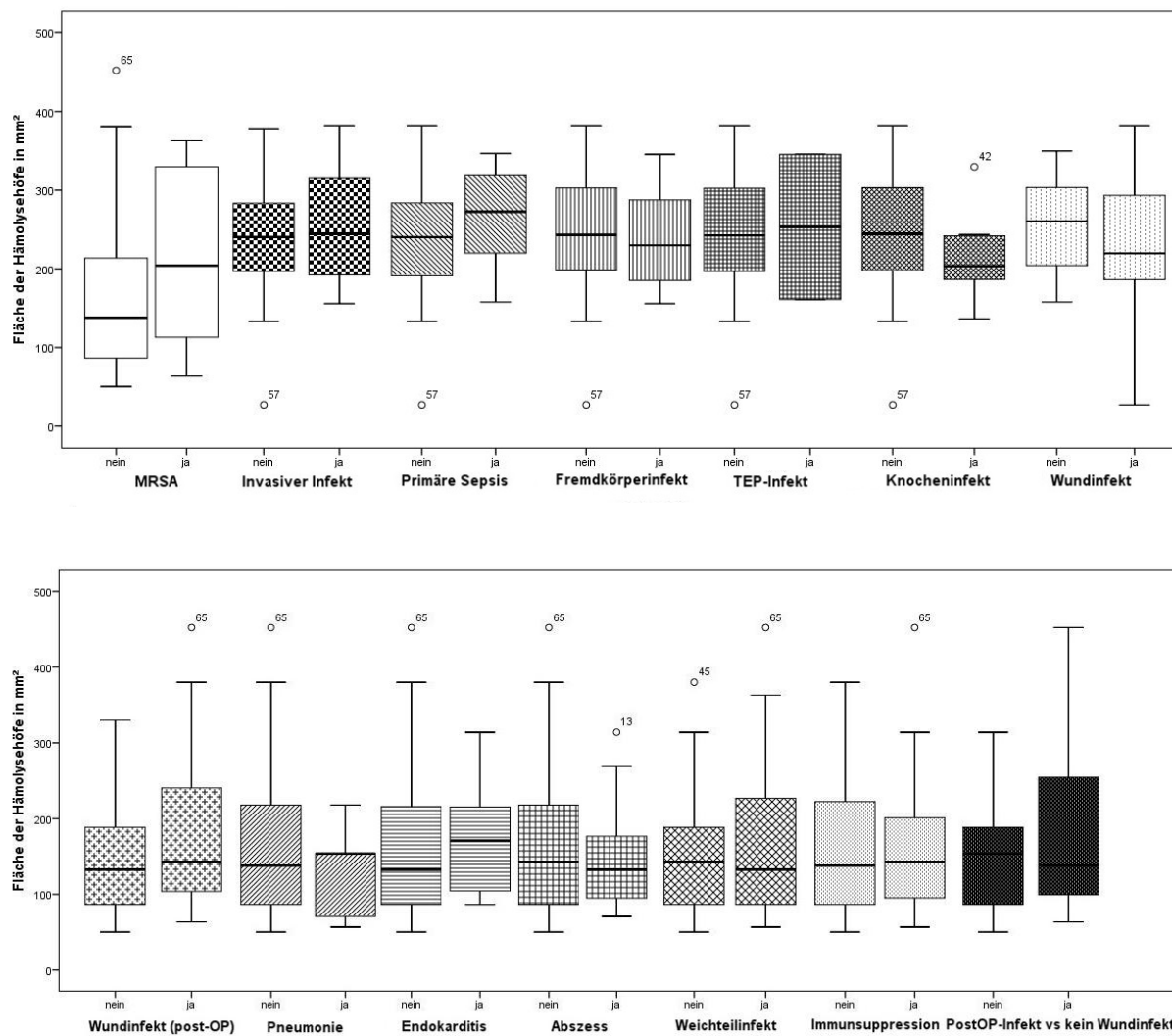


Abbildung 16 Boxplots: Fläche der Hämolysehöfe in mm²

In diesem Kapitel erfolgt eine einordnende Diskussion der Ergebnisse in den derzeitigen Forschungsstand. Zuerst werden die Ergebnisse der Siderophore diskutiert, es folgt eine Diskussion der Ergebnisse für die Proteasen und für Alpha-Hämolysin.

Die vorliegende Arbeit konnte zeigen, dass die Produktion von Siderophoren in vitro nicht mit der Ausbildung einer der untersuchten Infektionen wie MRSA, invasive Infektion, primäre Sepsis, fremdkörperassoziierte Infektion, TEP-Infekt, Knocheninfekt, Wundinfekt, postoperativer Wundinfekt, Pneumonie, Endokarditis, Abszess, ausgedehnter Weichteilinfekt und Infekt bei immunsupprimierten Patienten assoziiert ist. Dieses Ergebnis ist unabhängig davon, ob nur die durch die Siderophore bedingte Absorptionsdifferenz betrachtet wurde oder die um Bakterien- oder Proteinkonzentration normierte Änderung der Absorption.

Über eine Assoziation der Siderophore mit einer spezifischen Erkrankung ist bisher nichts publiziert worden. Wie bereits in der Einleitung erwähnt, lässt die Bedeutung des Eisens für den Stoffwechsel von *S. aureus* vermuten, dass ein Mangel an Eisen, der durch eine geringere Siderophore Konzentration bedingt sein könnte, einen Nachteil bei der Auslösung einer Infektion darstellt. Lediglich im Tierversuch konnte gezeigt werden, dass eine fehlende Produktion von Staphyloferrin B zu einer reduzierten Pathogenität führt (12). In bestimmten Kompartimenten des Körpers (beispielsweise in Blutgefäßen) hat *S. aureus* auch die Möglichkeit Eisen aus Häm zu akquirieren. Deshalb erschien die Frage, ob bei der Sepsis oder der Endokarditis die Konzentration an Siderophoren geringer ist als beispielsweise bei der Pneumonie oder einem Abszess, spannend. Es konnte jedoch keine Assoziation zwischen Siderophorkonzentration und Krankheit nachgewiesen werden. Dies könnte an einigen Limitationen liegen wie beispielsweise der niedrigen Fallzahl einiger Erkrankungen wie der Endokarditis, Fremdkörper assoziierter Infektionen oder den MRSA. Eine weitere Limitation ist, dass es sich um eine retrospektive monozentrische Studie handelt. Lediglich

bei der Endokarditis zeigte sich ein Trend zu höherer Produktion von Siderophoren bei Isolaten von Endokarditispatienten, der aufgrund der geringen Fallzahl (n=8) keine Signifikanz erreichte.

Ferner sind die Ergebnisse unter Umständen mit den Verhältnissen in vivo nicht direkt vergleichbar. Zum einen werden die an der Synthese und am Transport von Siderophoren beteiligten Proteine im Blut deutlich stärker induziert als in einem Nährmedium wie TSB, in dem die Expression der Gene supprimiert wird (46). Um dieses Problem zu umgehen wurde als Nährmedium RPMI, indem Eisen in einer dem menschlichen Serum ähnlicher Konzentration gelöst ist, verwendet. Um nun zu beurteilen, ob die in vitro gemessenen Werte auf die Verhältnisse in vivo zu übertragen sind, müsste Gegenstand folgender Untersuchungen sein, inwieweit die Induktion der an der Eisenaufnahme beteiligten Proteine in RPMI der in menschlichen Serum ähnelt. Dies könnte in ähnlicher Form der von Malachowa et al.(46) durchgeführten Studie erfolgen. Zum anderen hängt die Endkonzentration der Siderophore von der Anwesenheit der Enzyme ab, die die Siderophore synthetisieren, den Genen, die für diese Enzyme kodieren und von den Substraten, aus denen die Siderophore aufgebaut sind. Es wäre denkbar, dass die Konzentrationen von Substraten in der verwendeten Nährlösung (s. Material und Methoden) von der in humanem Serum abweicht, sodass sich dadurch eine Einschränkung der Übertragbarkeit der Ergebnisse dieser Studie auf die Verhältnisse in vivo ergibt. Ebenso könnte die Aktivität der Enzyme, die die Siderophore synthetisieren in vivo anders sein. Es erscheint daher interessant, sich genauer mit diesen Gruppen zu beschäftigen, um eine Aussage über die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf die Verhältnisse in vivo treffen zu können.

Eine Aussage über die Relevanz der Eisenakquisition für die Pathogenese unterschiedlicher *S. aureus* Infekte lässt sich aus dieser Studie nicht direkt ableiten. Dies liegt daran, dass neben den untersuchten Siderophoren auch andere Faktoren zur Versorgung der

Staphylokokken mit dem essenziellen Spurenelement Eisen zur Verfügung stehen. So ist neben der Beschaffung des Eisens über selbst synthetisierte Siderophore auch die Expression der an der Aufnahme der Siderophore beteiligten Transporter für eine suffiziente Versorgung der Staphylokokken nötig ist. Ferner sind auch andere Mechanismen zur Eisenbeschaffung von *S. aureus* zu betrachten wie z.B. die Aufnahme von Eisenhydroxamat-Komplexen (9) und Aufnahme von Häm (10). Um nun die Bedeutung der Eisenakquisition für die Pathogenese unterschiedlicher durch *S. aureus* zu klären, könnte es interessant sein, auch die anderen Stoffwechselwege zu betrachten: Unter anderem die zur Bildung von Staphyloferrin A nötigen NIS-Synthetasen SfaD und SfaB und deren Substrate D-Ornithin und Zitronensäure (8). Ebenso die an der Aufnahme von Staphyloferrin beteiligten Transporter Für die HtsA, HtsBC und die ATPase FhuC. Ein Mangel an Fur fördert die Transkription der genannten Enzyme, sodass auch dessen Konzentration betrachtet werden müsste (10). Ferner müssten die an der Synthese und dem Transport von Staphyloferrin beteiligten Proteine betrachtet werden. Also die NIS-Synthetasen SbnE, SbnC, SbnF und die ebenso wichtige Decarboxylase SbnH (11) und deren Substrate L-2,3-Diaminopropionsäure, Zitronensäure, 1,2-Diaminoethan und α -Ketoglutarensäure (11), sowie der für den Transport wichtige ABC Transporter und die ATPase FhuC (12). Ferner die an der Synthese und dem Transport von Aureochelin und Staphylobactin beteiligten Proteine und die die Konzentration an Xenosiderophoren und der an deren Aufnahme beteiligten Transporter.

In dieser Arbeit wurde ebenso gezeigt, dass Staphylokokken, die einen postoperativen Wundinfekt verursachen eine signifikant höhere proteolytische Aktivität haben als Staphylokokken, die keinen postoperativen Wundinfekt verursacht haben ($P=0,012$). Noch deutlicher wird dieser Effekt, wenn man Staphylokokken, die einen postoperativen Wundinfekt verursacht haben, mit Staphylokokken, die keinen Wundinfekt verursacht haben, vergleicht ($P=0,006$).

Es wurde außerdem gezeigt, dass die Produktion von Proteasen in vitro keine signifikante Assoziation mit Ausbildung einer der anderen untersuchten Infektionen wie MRSA, invasive Infektion, primäre Sepsis, fremdkörperassoziierte Infektion, TEP-Infekt, Knocheninfekt, Pneumonie, Endokarditis, Abszess, ausgedehnter Weichteilinfekt und Infekt bei immunsupprimierten Patienten zeigt.

Für die Entstehung einer primären Sepsis spielt, wie diese Arbeit zeigt, die proteolytische Gesamtaktivität keine Rolle. Dies wird auch durch eine Studie von Gustafsson et al gestützt, bei der 37 invasive *S. aureus* Stämme eine Sepsis verursachten. Alle Stämme wiesen ein unterschiedliches Expressionsmuster extrazellulärer Proteasen auf, welche nicht mit der Ausbildung einer Sepsis korrelierte (59). Ob jedoch spezifische Proteasen zur Entstehung eines septischen Krankheitsbildes beitragen, ist in der Forschung umstritten. Es wäre möglich, dass SplC für die Entstehung der Sepsis relevant ist. Zwar konnte Zdzalik et al. keinen Zusammenhang zwischen der Prävalenz von Genen, die Proteasen codieren, und bestimmten Krankheitsmustern erkennen (4). Im Serum von Patienten, die an einer durch *S. aureus* verursachten Sepsis erkrankt sind, konnten jedoch hohe Konzentrationen an Antikörpern gegen SplC nachgewiesen werden (20). Es wäre also denkbar, dass SplC eine Bedeutung bei der Pathogenese der durch *S. aureus* induzierten Sepsis zukommt. Die proteolytische Gesamtaktivität stellt jedoch keinen die Entstehung einer Sepsis begünstigenden Faktor dar.

Die proteolytische Gesamtaktivität steht nicht mit einer erhöhten Zahl fremdkörperassoziierten Infekten im Zusammenhang. Es wäre durchaus denkbar gewesen, dass die proteolytische Gesamtaktivität bei fremdkörperassoziierten Infekten reduziert ist. Schließlich ist bekannt, dass Aureolysin das Biofilm assoziierte Protein (Bap) spaltet (26). Dies erleichtert es Staphylokokken sich aus dem Verbund der des Biofilms zu lösen und invasiv zu werden. Gleiches gilt für V8, Bap wird ebenfalls von V8 gespalten (26). Somit konnte diese Arbeit entgegen initialer Annahmen zeigen, dass kein Zusammenhang zwischen Fremdkörper assoziierten Infekten und proteolytischer Gesamtaktivität besteht.

Ein Grund für Infektionen in der postoperativen Wundheilung könnte sein, dass die Ausbildung eines Fibrinnetzes in der exsudativen Phase der Wundheilung behindert wird. Aureolysin aktiviert die Fibrinolyse indem es Aktivatoren der Fibrinolyse aktiviert: Pro-UPA in seine aktive Form UPA (Urokinase Plasminogenaktivator) spaltet. Ferner aktiviert Aureolysin die Fibrinolyse indem es Inhibitoren der Fibrinolyse hemmt: Aureolysin aktiviert α 2-AP und PAI-1. Diese Eigenschaft von Aureolysin könnte eine besondere Bedeutung für Staphylokinase-defiziente Stämme haben, da diese Plasminogen nicht direkt durch die Staphylokinaseaktivität in Plasmin spalten können (27). Es wurden aber auch gerinnungsfördernde Eigenschaften von Aureolysin beschrieben. So soll Aureolysin Prothrombin aktivieren (28).

Ein anderer Grund könnte sein, dass Aureolysin und V8 das Immunsystem umgehen bzw. behindern. Aureolysin inaktiviert C3 und umgeht damit die Komplement vermittelte Immunantwort. Aureolysin spaltet C3 zwei Aminosäuren von der physiologischen Bindungsstelle entfernt, sodass dennoch funktionsfähiges C3a und C3b entstehen. Das C3b ist aufgrund der anderen Bindungsstelle zugänglich für eine wirtseigene Hydrolyse und damit einer Inaktivierung (29). Eine weitere Eigenschaft von Aureolysin fördert das Umgehen der Immunantwort des Wirts: Aureolysin inhibiert die Aktivierung von Lymphozyten durch polyklonale AK, eine proteolytische Wirkung auf Serum Ig hat Aureolysin jedoch nicht (30). V8 hingen spaltet einige Serumproteine, es kann beispielsweise alle humanen Immunglobulinklassen an den schweren Ketten spalten und somit funktionsuntüchtig machen (15). Neben Aureolysin haben weitere Proteasen von *S. aureus* die Eigenschaft die Komplement-vermittelte Immunantwort zu umgehen. Jusko et al beschrieben 2014, dass die vier Hauptproteasen von *S. aureus* potente Inhibitoren von Komplement sind (60).

Frühere Arbeiten haben bereits gezeigt, dass V8 keine Rolle bei der Ausbildung von Abszessen spielt (36). Diese Arbeit zeigt darüber hinaus, dass auch die proteolytische Gesamtaktivität nicht mit der Ausbildung von Abszessen assoziiert ist.

Eine hohe proteolytische Aktivität stellt keinen begünstigenden Faktor bei Immunsuppression dar, obwohl dies aufgrund der Eigenschaft von V8 möglich erschien. V8 kann alle humanen Immunglobulinklassen an den schweren Ketten spalten und somit funktionsuntüchtig machen (15). Der Körper reagiert auf V8 jedoch mit der Produktion von V8 induzierten V8 spezifische Antikörper, welche die Fähigkeit aufweisen V8 zu inhibieren (34). Es wäre denkbar gewesen, dass diese Inhibition der V8 Protease durch die Immunsuppression eingeschränkt wird und *S. aureus* somit leichter eine Infektion auslösen kann. Die vorliegende Arbeit konnte jedoch zeigen, dass hier keine Assoziation besteht.

Die vorliegende Arbeit ist nach bestem Wissen die erste Arbeit, die zeigt, dass es eine Assoziation zwischen postoperativem Wundinfekt und der Sekretion von Proteasen durch *S. aureus* gibt. Über die Gründe warum dies so ist, lässt sich anhand der aktuellen Forschungsliteratur jedoch nur spekulieren. Aureolysin und V8 behindern das Immunsystem, Aureolysin fördert darüber hinaus die Fibrinolyse und die Invasivität ins Gewebe. Aureolysin kann Matrixproteasen aktivieren und ist somit wichtig beim Eindringen in das Wirtsgewebe (23).

Von diesen Ergebnissen lässt sich jedoch kein direkter Rückschluss auf die Verhältnisse in vivo ziehen. Es ist bekannt, dass die Transkription der Proteasen in Abhängigkeit vom Nährmedium variiert. So wird die Transkription der Proteasen in TSB und Vollblut stark supprimiert (46). Es ist jedoch noch zu erforschen, wie die Transkription von Proteasen in dem hier verwendeten CHB verändert wird.

Es konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Produktion von Alpha-Hämolysin in vitro keine signifikante Assoziation mit Ausbildung einer der untersuchten Infektionen wie MRSA, invasive Infektion, primäre Sepsis, fremdkörperassoziierte Infektion, TEP-Infekt, Knocheninfekt, Wundinfekt, postoperativer Wundinfekt, Pneumonie, Endokarditis, Abszess, ausgedehnter Weichteilinfekt und Infekt bei immunsupprimierten Patienten zeigt.

Im Folgenden werden die Ergebnisse soweit dies möglich ist in den aktuellen Stand der Forschung eingeordnet.

Alpha-Hämolysin hat einen Einfluss auf die Schwere der Infektion, so besteht ein Zusammenhang zwischen letalen Infektionen und Synthese von Alpha-Hämolysin (61). Dies lässt sich dadurch erklären, dass Alpha-Hämolysin zum Zelluntergang vieler immunologisch wichtiger Zellen führt wie z.B. T-Lymphozyten (37), eosinophilen Granulozyten (62) und Monozyten (40). Ein weiterer Grund ist, dass Alpha-Hämolysin die Invasion in Gewebe ermöglicht, indem es Keratinozyten und Endothelzellen lysiert (40). Es erscheint daher interessant in kommenden Studien die Schwere unterschiedlicher Infektionen in Abhängigkeit der Konzentration von Alpha-Hämolysin zu betrachten.

Dies ist nach bestem Wissen die erste Arbeit die zeigt, dass eine erhöhte Konzentration an Alpha-Hämolysin in vitro nicht mit einer erhöhten Inzidenz von MRSA-Infektionen, Wundinfektionen, Knocheninfekten, Endokarditiden, ausgedehnten Weichteilinfekten, Wundinfekt postoperativ, Wundinfekt allgemein und Infektionen bei Immunsupprimierten assoziiert ist.

Die Relevanz von Alpha-Hämolysin bei der Ausbildung der Sepsis konnte im Mausmodell gezeigt werden (63). Ein Mechanismus ist, dass Alpha-Hämolysin eine Funktionsstörungen des intestinalen Epithels verursacht, sodass der Übertritt intestinaler Bakterien in den Blutstrom erleichtert wird (64). Dass diese Arbeit keinen Zusammenhang zwischen Sepsis und Alpha-Hämolysinproduktion nachgewiesen hat, könnte daran liegen, dass in vivo viele Virulenzfaktoren eine Rolle spielen von denen Alpha-Hämolysin nur einer ist.

Ein Ergebnis dieser Arbeit war, dass kein Zusammenhang zwischen Alpha-Hämolysin-Konzentration und Ausbildung invasiver Infekte besteht. Beschrieben ist bereits, dass Hämolysine an der Entstehung der septischen Arthritis beteiligt sind, wobei Alpha-, Beta-, und Gamma-toxin-defiziente Mutanten eine niedrigere Frequenz und Schwere der septischen Arthritis zeigten (65). Es wäre bei zukünftigen Studien also interessant auch die

anderen Hämolsine zu bestimmen, um zu sehen, ob sich die Bedeutung der Hämolsine für die Pathogenese der septischen Arthritis auf invasive Infektionen generalisieren lässt.

Caiazza et al. 2003 Alpha-Hämolsin eine entscheidende Bedeutung bei der Bildung von Biofilmen zugesprochen (66). Es wäre somit zu vermuten gewesen, dass hohe Alpha-Hämolsin Spiegel mit der Ausbildung von fremdkörperassoziierten Infekten assoziiert ist. In dieser Studie wurde jedoch gezeigt, dass hier keine Assoziation besteht.

Im Tiermodell konnte gezeigt werden, dass Alpha-Hämolsin ein wichtiger Virulenzfaktor der *S.aureus*-Pneumonie ist. In dieser Arbeit zeigte sich keine signifikante Assoziation von Alpha-Hämolsin Produktion und Entstehung einer Pneumonie. Dies könnte zwei Gründe haben: Ein Grund, warum in dieser Arbeit keine signifikante Assoziation nachgewiesen wurde, könnte an der geringen Fallzahl der Pneumonien liegen (n=5). Ein weiterer Grund könnte daran liegen, dass Alpha-Toxin zur Induktion einer Pneumonie durch Störung der zellulären Adhäsion des Respirationsepithels ADAM10 benötigt (67). Es wäre daher interessant, in weiteren Untersuchungen über den Zusammenhang von Alpha-Hämolsin und Pneumonie eine Studie mit einer höheren Fallzahl und einer Betrachtung der Aktivität von ADAM10- vorzunehmen.

Für intraperitoneale Abszesse wurde bereits gezeigt, dass kein Zusammenhang zwischen Häufigkeit der Abszessbildung und Produktion von Alpha-Hämolsin besteht (61). Diese Arbeit legt den gleichen Schluss für Abszesse unabhängig ihrer Lokalisation nahe.

Inwiefern diese Ergebnisse in vitro auf die Verhältnisse in vivo schließen lassen ist unbekannt, da bisher nicht erforscht wurde wie sich die Expression des Alpha-Hämolsins in Abhängigkeit des Kulturmediums verhält. Bekannt ist, dass die Synthese von Alpha-Hämolsin beispielsweise im Vollblut deutlich stärker induziert wird als in TSB (46). Wie sich jedoch die Expression der Gene beim Vergleich des Wachstumsmediums Blut und Blutagarplatte unterscheidet, ist unklar.

Um von den Ergebnissen in vitro auf den Effekt von Alpha-Hämolysin in vivo schließen zu können, wäre es ferner interessant gewesen weitere Stoffe zu erfassen, die die Expression oder die Funktionsfähigkeit von Alpha-Hämolysin beeinflussen. Interessant wären beispielweise die durch die Nahrung zugeführten Stoffe Flavonoide (42) und Allicin (43). Ebenso wäre die Einnahme von Simvastatin (45), Hydrokortison und Methylprednisolon zu betrachten (38).

Die vorliegende Arbeit konnte zeigen, dass die Produktion von **Siderophoren** keine signifikante Assoziation mit der Ausbildung einer der untersuchten Infektionen wie MRSA, invasive Infektion, primäre Sepsis, fremdkörperassoziierte Infektion, TEP-Infekt, Knocheninfekt, Wundinfekt, postoperativer Wundinfekt, Pneumonie, Endokarditis, Abszess, ausgedehnter Weichteilinfekt und Infekt bei immunsupprimierten Patienten in vitro aufweist. Es wurde lediglich ein Trend zu einer höheren Siderophorproduktion durch *S. aureus* Isolate von Endokarditispatienten beobachtet, der aufgrund der niedrigen Fallzahl jedoch nicht signifikant war.

Hinsichtlich der Produktion von **Proteasen** wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass Staphylokokken, die einen postoperativen Wundinfekt verursachen eine signifikant höhere proteolytische Gesamtaktivität aufweisen als die anderen Staphylokokken ($P=0,012$). Eine signifikante Assoziation der Produktion von Proteasen in vitro mit der Ausbildung einer der anderen oben genannten untersuchten Infektionen war nicht zu beobachten. Gleiches galt für die Produktion von **Alpha-Hämolysin**. Eine signifikante Assoziation der Aktivität von Alpha-Hämolysin einer der untersuchten Infektionen wie MRSA, invasive Infektion, primäre Sepsis, fremdkörperassoziierte Infektion, TEP-Infekt, Knocheninfekt, Wundinfekt, postoperativer Wundinfekt, Pneumonie, Endokarditis, Abszess, ausgedehnter Weichteilinfekt und Infekt bei immunsupprimierten Patienten wurde nicht festgestellt.

Ich möchte mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Bernd Salzberger für die Betreuung und Begutachtung dieser Arbeit bedanken.

Mein Dank gilt ebenso Doktor Frank Hanses, bei dem ich mich für die freundliche Überlassung des hochinteressanten Themas, sowie für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes herzlich bedanken möchte. Darüber hinaus danke ich Doktor Hanses für die hilfreiche Unterstützung und die vielen anregenden Diskussionen. Jede Phase dieser Arbeit wurde von Ihnen intensiv und professionell betreut. Besonders dankend hervorheben möchte ich, dass ich während des gesamten Forschungsprojekts stets die Freiheit hatte eigenen Ideen nachzugehen. All dies hat maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Mein besonderer Dank gilt auch Frau Irina Fink. Jederzeit gewährte sie mir bei der Planung und Durchführung wertvolle Unterstützung. Sie hat mir bei meiner Arbeit mit großem Engagement tatkräftig geholfen.

Bedanken möchte ich mich auch beim Team des Instituts für Mikrobiologie, die mir freundlicherweise durch das zur Verfügung stellen diverser Materialien stets sehr weiter geholfen haben.

Ein ganz besonderer Dank geht an meine Familie und meine Freunde, die stets bereit waren mir die Unterstützung und den Beistand zu geben, den ich dringend benötigte. Vor allem danke ich für die Ausdauer, Ruhe und Geduld, die mir entgegen gebracht wurde.

Referenzen:

1. P. Gastmeier CG. Nosokomiale Infektionen in Deutschland: Wie viele gibt es wirklich? Eine Schätzung für das Jahr 2006. Dtsch med Wochenschr. 2008;1111-5.
2. Risikobewertung Bf. Fragen und Antworten zu Methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus* (MRSA).
3. Archer GL. *Staphylococcus aureus*: A Well-Armed Pathogen. Clinical Infectious Diseases. 1998;26(5):1179-81.
4. Zdzalik M, Karim AY, Wolski K, et al. Prevalence of genes encoding extracellular proteases in *Staphylococcus aureus* – important targets triggering immune response in vivo. FEMS Immunology & Medical Microbiology. 2012;66(2):220-9.
5. Chan PF, Foster SJ. Role of SarA in Virulence Determinant Production and Environmental Signal Transduction in *Staphylococcus aureus*. Journal of Bacteriology. 1998;180(23):6232-41.
6. Rassow J, Deutzmann R, Netzker R, Hauser K. Duale Reihe Biochemie. Thieme 2012;3. Auflage
7. Beasley FC, Vinés ED, Grigg JC, et al. Characterization of staphyloferrin A biosynthetic and transport mutants in *Staphylococcus aureus*. Molecular Microbiology. 2009;72(4):947-63.
8. Cotton JL, Tao J, Balibar CJ. Identification and Characterization of the *Staphylococcus aureus* Gene Cluster Coding for Staphyloferrin A†. Biochemistry. 2009;48(5):1025-35.
9. Cabrera G, Xiong A, Uebel M, Singh VK, Jayaswal RK. Molecular Characterization of the Iron-Hydroxamate Uptake System in *Staphylococcus aureus*. Applied and Environmental Microbiology. 2001;67(2):1001-3.
10. Hammer ND, Skaar EP. Molecular Mechanisms of *Staphylococcus aureus* Iron Acquisition. Annual Review of Microbiology. 2011;65(1):129-47.
11. Cheung J, Beasley FC, Liu S, Lajoie GA, Heinrichs DE. Molecular characterization of staphyloferrin B biosynthesis in *Staphylococcus aureus*. Molecular Microbiology. 2009;74(3):594-608.
12. Dale SE, Doherty-Kirby A, Lajoie G, Heinrichs DE. Role of Siderophore Biosynthesis in Virulence of *Staphylococcus aureus*: Identification and Characterization of Genes Involved in Production of a Siderophore. Infection and Immunity. 2004;72(1):29-37.
13. Sebulsky MT, Hohnstein D, Hunter MD, Heinrichs DE. Identification and Characterization of a Membrane Permease Involved in Iron-Hydroxamate Transport in *Staphylococcus aureus*. Journal of Bacteriology. 2000;182(16):4394-400.
14. Sebulsky MT, Heinrichs DE. Identification and Characterization of *fhuD1* and *fhuD2*, Two Genes Involved in Iron-Hydroxamate Uptake in *Staphylococcus aureus*. Journal of Bacteriology. 2001;183(17):4994-5000.
15. Reed SB, Wesson CA, Liou LE, et al. Molecular Characterization of a Novel *Staphylococcus aureus* Serine Protease Operon. Infection and Immunity. 2001;69(3):1521-7.
16. Shaw L, Golonka E, Potempa J, Foster SJ. The role and regulation of the extracellular proteases of *Staphylococcus aureus*. Microbiology. 2004;150(1):217-28.
17. Kalińska M, Kantyka T, Greenbaum DC, et al. Substrate specificity of *Staphylococcus aureus* cysteine proteases – Staphopains A, B and C. Biochimie. 2012;94(2):318-27.
18. Stec-niemczyk J, Pustelny K, Kisiełowska M, et al. Structural and functional characterization of SplA, an exclusively specific protease of *Staphylococcus aureus*. Biochem J. 2009;419(3):555-64.
19. Dubin G, Stec-Niemczyk J, Kisiełowska M, et al. Enzymatic Activity of the *Staphylococcus aureus* SplB Serine Protease is Induced by Substrates Containing the Sequence Trp-Glu-Leu-Gln. Journal of Molecular Biology. 2008;379(2):343-56.
20. Popowicz GM, Dubin G, Stec-Niemczyk J, et al. Functional and Structural Characterization of Spl Proteases from *Staphylococcus aureus*. Journal of Molecular Biology. 2006;358(1):270-9.
21. Jong Woo Park JEP, Jong Kun Park, Jung Sup Lee Purification and biochemical characterization of a novel glutamyl endopeptidase secreted by a clinical isolate of *Staphylococcus aureus*. International Journal of Molecular Medicine 2011 637-45
22. Miedzobrodzki J, Kaszycki P, Bialecka A, Kasprończ A. Proteolytic Activity of *Staphylococcus aureus* Strains Isolated from the Colonized Skin of Patients with Acute-Phase Atopic Dermatitis. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2002;21(4):269-76.
23. Banbula A PJ, Travis J, Fernandez-Catalán C, Mann K, Huber R, Bode W, Medrano F. Amino-acid sequence and three-dimensional structure of the *Staphylococcus aureus* metalloproteinase at 1.72 Å resolution. Structure. 1998;1185-93.
24. Nickerson NN, Joag V, McGavin MJ. Rapid autocatalytic activation of the M4 metalloprotease aureolysin is controlled by a conserved N-terminal fungalysin-thermolysin-propeptide domain. Molecular Microbiology. 2008;69(6):1530-43.

25. Gustafsson E, Oscarsson J. Maximal transcription of *aur* (aureolysin) and *sspA* (serine protease) in *Staphylococcus aureus* requires staphylococcal accessory regulator R (*sarR*) activity. *FEMS Microbiology Letters*. 2008;284(2):158-64.
26. Martí M, Trotonda MP, Tormo-Más MÁ, et al. Extracellular proteases inhibit protein-dependent biofilm formation in *Staphylococcus aureus*. *Microbes and Infection*. 2010;12(1):55-64.
27. Beaufort N, Wojciechowski P, Sommerhoff CP, et al. The human fibrinolytic system is a target for the staphylococcal metalloprotease aureolysin. *Biochem J*. 2008;410(1):157-65.
28. Wegrzynowicz Z, Heczko PB, Drapeau GR, Jeljaszewicz J, Pulverer G. Prothrombin activation by a metalloprotease from *Staphylococcus aureus*. *Journal of Clinical Microbiology*. 1980;12(2):138-9.
29. Laarman AJ, Ruyken M, Malone CL, van Strijp JAG, Horswill AR, Rooijakkers SHM. *Staphylococcus aureus* Metalloprotease Aureolysin Cleaves Complement C3 To Mediate Immune Evasion. *The Journal of Immunology*. 2011;186(11):6445-53.
30. Prokesová L P-BZ, Baran K, Potempa J, Pospíšil M, John C. Effect of metalloproteinase from *Staphylococcus aureus* on in vitro stimulation of human lymphocytes. *Immunol Lett*. 1991;225-30.
31. Prasad L, Leduc Y, Hayakawa K, Delbaere LTJ. The structure of a universally employed enzyme: V8 protease from *Staphylococcus aureus*. *Acta Crystallographica Section D*. 2004;60(2):256-9.
32. Drapeau GR, Boily Y, Houmard J. Purification and Properties of an Extracellular Protease of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Biological Chemistry*. 1972;247(20):6720-6.
33. Nemoto TK, Ohara-Nemoto Y, Ono T, et al. Characterization of the glutamyl endopeptidase from *Staphylococcus aureus* expressed in *Escherichia coli*. *FEBS Journal*. 2008;275(3):573-87.
34. Calander A-M, Dubin G, Potempa J, Tarkowski A. *Staphylococcus aureus* infection triggers production of neutralizing, V8 protease-specific antibodies. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*. 2008;52(2):267-72.
35. Oscarsson J, Tegmark-Wisell K, Arvidson S. Coordinated and differential control of aureolysin (*aur*) and serine protease (*sspA*) transcription in *Staphylococcus aureus* by *sarA*, *rot* and *agr* (RNAIII). *International Journal of Medical Microbiology*. 2006;296(6):365-80.
36. Rice K, Peralta R, Bast D, de Azavedo J, McGavin MJ. Description of *Staphylococcus* Serine Protease (*ssp*) Operon in *Staphylococcus aureus* and Nonpolar Inactivation of *sspA*-Encoded Serine Protease. *Infection and Immunity*. 2001;69(1):159-69.
37. Palmer M, Weller U, Messner M, Bhakdi S. Altered pore-forming properties of proteolytically nicked staphylococcal α -toxin. *Journal of Biological Chemistry*. 1993;268(16):11963-7.
38. Tranum-Jensen SBJ. α -Toxin of *Staphylococcus aureus*. *American Society for Microbiology*. 1991:733-51.
39. Meesters C, Brack A, Hellmann N, Decker H. Structural characterization of the α -hemolysin monomer from *Staphylococcus aureus*. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*. 2009;75(1):118-26.
40. Gouaux E. α -Hemolysin from *Staphylococcus aureus*: An Archetype of β -Barrel, Channel-Forming Toxins. *Journal of Structural Biology*. 1998;121(2):110-22.
41. Furini S, Domene C, Rossi M, Tartagni M, Cavalcanti S. Model-Based Prediction of the α -Hemolysin Structure in the Hexameric State. *Biophysical Journal*. 2008;95(5):2265-74.
42. Lee J-H, Park J-H, Cho M, Lee J. Flavone Reduces the Production of Virulence Factors, Staphyloxanthin and α -Hemolysin, in *Staphylococcus aureus*. *Curr Microbiol*. 2012;65(6):726-32.
43. Leng B-F, Qiu J-Z, Dai X-H, et al. Allicin Reduces the Production of α -Toxin by *Staphylococcus aureus*. *Molecules*. 2011;16(9):7958-68.
44. McCormick CC, Caballero AR, Balzli CL, Tang A, O'Callaghan RJ. Chemical Inhibition of α -Toxin, a Key Corneal Virulence Factor of *Staphylococcus aureus*. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 2009;50(6):2848-54.
45. Pruefer D, Makowski J, Schnell M, et al. Simvastatin Inhibits Inflammatory Properties of *Staphylococcus aureus* α -Toxin. *Circulation*. 2002;106(16):2104-10.
46. Malachowa N, Whitney AR, Kobayashi SD, et al. Global Changes in *Staphylococcus aureus* Gene Expression in Human Blood. *PLoS ONE*. 2011;6(4):e18617.
47. Essmann F, Bantel H, Totzke G, et al. *Staphylococcus aureus* α -toxin-induced cell death: predominant necrosis despite apoptotic caspase activation. *Cell Death Differ*. 2003;10(11):1260-72.
48. Schmidt KA, Manna AC, Gill S, Cheung AL. *SarT*, a Repressor of α -Hemolysin in *Staphylococcus aureus*. *Infection and Immunity*. 2001;69(8):4749-58.
49. Oscarsson J, Kanth A, Tegmark-Wisell K, Arvidson S. *SarA* Is a Repressor of *hla* (α -Hemolysin) Transcription in *Staphylococcus aureus*: Its Apparent Role as an Activator of *hla* in the Prototype Strain NCTC 8325 Depends on Reduced Expression of *sarS*. *Journal of Bacteriology*. 2006;188(24):8526-33.

50. Xiong YQ, Willard J, Yeaman MR, Cheung AL, Bayer AS. Regulation of *Staphylococcus aureus* α -Toxin Gene (*hla*) Expression by *agr*, *sarA* and *sae* In Vitro and in Experimental Infective Endocarditis. *Journal of Infectious Diseases*. 2006;194(9):1267-75.
51. Schwyn B, Neilands JB. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Analytical Biochemistry*. 1987;160(1):47-56.
52. Pernesig A-K, Georgellis D, Romeo T, et al. The *Escherichia coli* BarA-UvrY Two-Component System Is Needed for Efficient Switching between Glycolytic and Gluconeogenic Carbon Sources. *Journal of Bacteriology*. 2003;185(3):843-53.
53. Wiegand I, Hilpert K, Hancock REW. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nat Protocols*. 2008;3(2):163-75.
54. Smith MJ, Shoolery JN, Schwyn B, Holden I, Neilands JB. Rhizobactin, a structurally novel siderophore from *Rhizobium meliloti*. *Journal of the American Chemical Society*. 1985;107(6):1739-43.
55. Twining SS. Fluorescein isothiocyanate-labeled casein assay for proteolytic enzymes. *Analytical Biochemistry*. 1984;143(1):30-4.
56. Runnels LW, Scarlata SF. Theory and application of fluorescence homotransfer to melittin oligomerization. *Biophysical Journal*. 1995;69(4):1569-83.
57. Karlsson A, Arvidson S. Variation in Extracellular Protease Production among Clinical Isolates of *Staphylococcus aureus* Due to Different Levels of Expression of the Protease Repressor *sarA*. *Infection and Immunity*. 2002;70(8):4239-46.
58. Cooper LZ, Weinstein L. Hemolysis of rabbit erythrocytes by purified staphylococcal α -Toxin. *J Bacteriol*. 1964
59. Gustafsson E, Jacobsson G, Nilsson P, Enroth H, Beronius MK, Andersson R, Arvidson S. Invasive *Staphylococcus aureus* strains are highly variable in PFGE patterns, *agr* group and exoprotein production. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases* 2009;41(8):577-583.
60. Jusko M, Potempa J, Kantyka T, Bielecka E, Miller HK, Kalinska M, Dubin G, Garred P, Shaw LN, Blom AM. Staphylococcal Proteases Aid in Evasion of the Human Complement System. *Journal of Innate Immunity* 2014;6(1):31-46.
61. Rauch S, DeDent AC, Kim HK, Bubeck Wardenburg J, Missiakas DM, Schneewind O. Abscess Formation and α -Hemolysin Induced Toxicity in a Mouse Model of *Staphylococcus aureus* Peritoneal Infection. *Infection and Immunity*. 2012;80(10):3721-32.
62. Prince LR, Graham KJ, Connolly J, et al. *Staphylococcus aureus* Induces Eosinophil Cell Death Mediated by α -hemolysin. *PLoS ONE*. 2012;7(2):e31506.
63. Powers ME, Kim HK, Wang Y, Bubeck Wardenburg J. ADAM10 Mediates Vascular Injury Induced by *Staphylococcus aureus* α -Hemolysin. *Journal of Infectious Diseases*. 2012;206(3):352-6.
64. Kwak Y-K, Vikström E, Magnusson K-E, Vécsey-Semjén B, Colque-Navarro P, Möllby R. The *Staphylococcus aureus* α -Toxin Perturbs the Barrier Function in Caco-2 Epithelial Cell Monolayers by Altering Junctional Integrity. *Infection and Immunity*. 2012;80(5):1670-80.
65. Nilsson I-M, Hartford O, Foster T, Tarkowski A. α -Toxin and γ -Toxin Jointly Promote *Staphylococcus aureus* Virulence in Murine Septic Arthritis. *Infection and Immunity*. 1999;67(3):1045-9.
66. Caiazza NC, O'Toole GA. α -Toxin Is Required for Biofilm Formation by *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology*. 2003;185(10):3214-7.
67. Niebuhr M, Gathmann M, Scharonow H, et al. Staphylococcal α -Toxin Is a Strong Inducer of Interleukin-17 in Humans. *Infection and Immunity*. 2011;79(4):1615-22.